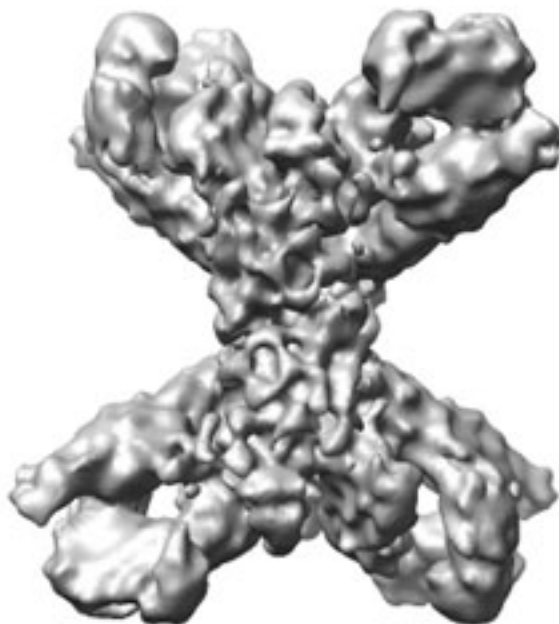




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Κινητικές Μελέτες στην Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου

Kinetic Studies on Glucogen Kinase Phosphorylase



ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ-ΜΑΡΙΑ
Λάρισα 2015

Κινητικές Μελέτες στην Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική**

Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος**

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2014-Φεβρουάριος 2015, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Οι συμβουλές, η υπομονή, η ενθάρρυνση, η καθοδήγηση και η βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια υπήρξαν πολύτιμες.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Καντσάδη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθειά της εντός και εκτός του εργαστηριακού χώρου που ήταν καταλυτική για την διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής εργασίας. Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Dr.Alberto Minassi του Πανεπιστημίου Piemonte Orientale της Νοβάρα καθώς απομόνωσε και μας διέθεσε τους ως προς μελέτη αναστολείς για την πτυχιακή μου εργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
1. Σακχαρώδης Διαβήτης.....	5
1.1 Ρόλος ινσουλίνης.....	5
1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου Ι.....	7
1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου ΙΙ.....	7
2. Γλυκόζη.....	8
3. Γλυκογόνο.....	10
3.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	12
4. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	13
4.1 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	15
5. Ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες.....	18
5.1 Καταλυτικός μηχανισμός πρωτεϊνικών κινασών.....	18
5.2 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	19
5.2.1 Δομή PhK.....	19
5.2.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες για την PhK.....	21
5.2.3 Σημασία υπομονάδων PhK.....	22
5.2.4 Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου PhK/Gpb.....	24
5.2.5 Ενεργοποίηση της PhK.....	25
6. Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως στόχος εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων.....	25
7. Κουρκουμίνες.....	26
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	27
2. Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli:.....	30
2.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός της γ καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	34
3.Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	38
4.Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (Km).....	38
4.1 Προσδιορισμός της δραστικότητας της γ-PhK ως προς ATP.....	39
4.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας της Gpa.....	40
5. Προσδιορισμός IC ₅₀ αναστολέων.....	43

6. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
1. Απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	47
2. Απομόνωση της γ υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.	48
2. Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	51
3. Κινητική μελέτη των φυσικών ενώσεων (Κουρκουμινών)	52
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	54
ABSTRACT.....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

1. Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία μεταβολική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου (γλυκόζη) στο αίμα. Είναι μία διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης που προκύπτει είτε ως αποτέλεσμα απουσίας ή μειωμένης έκκρισης ινσουλίνης (διαβήτης τύπου I) είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη (διαβήτης τύπου II) που οδηγεί σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου I, που ονομάζεται και νεανικός διαβήτης, εμφανίζεται κυρίως σε νεαρά άτομα όπου συμβαίνει καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες εκκρίνουν την ινσουλίνη. Αντίθετα, ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και διαβήτης των ενηλίκων και εμφανίζεται συνήθως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (άνω των 40 ετών).

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF), 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Μέσα στις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχουμε δραματική αύξηση του ποσοστού των ασθενών [*Oikonomakos., 2002*]. Το ποσοστό στην Ελλάδα ανέρχεται στο 10% και από αυτούς, το 80% είναι παχύσαρκοι ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει από την Ελληνική Εταιρία Παχυσαρκίας, περίπου το 40% ανδρών και γυναικών είναι παχύσαρκοι, γεγονός που κατατάσσει την Ελλάδα στις πρώτες θέσεις κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδους διαβήτη.

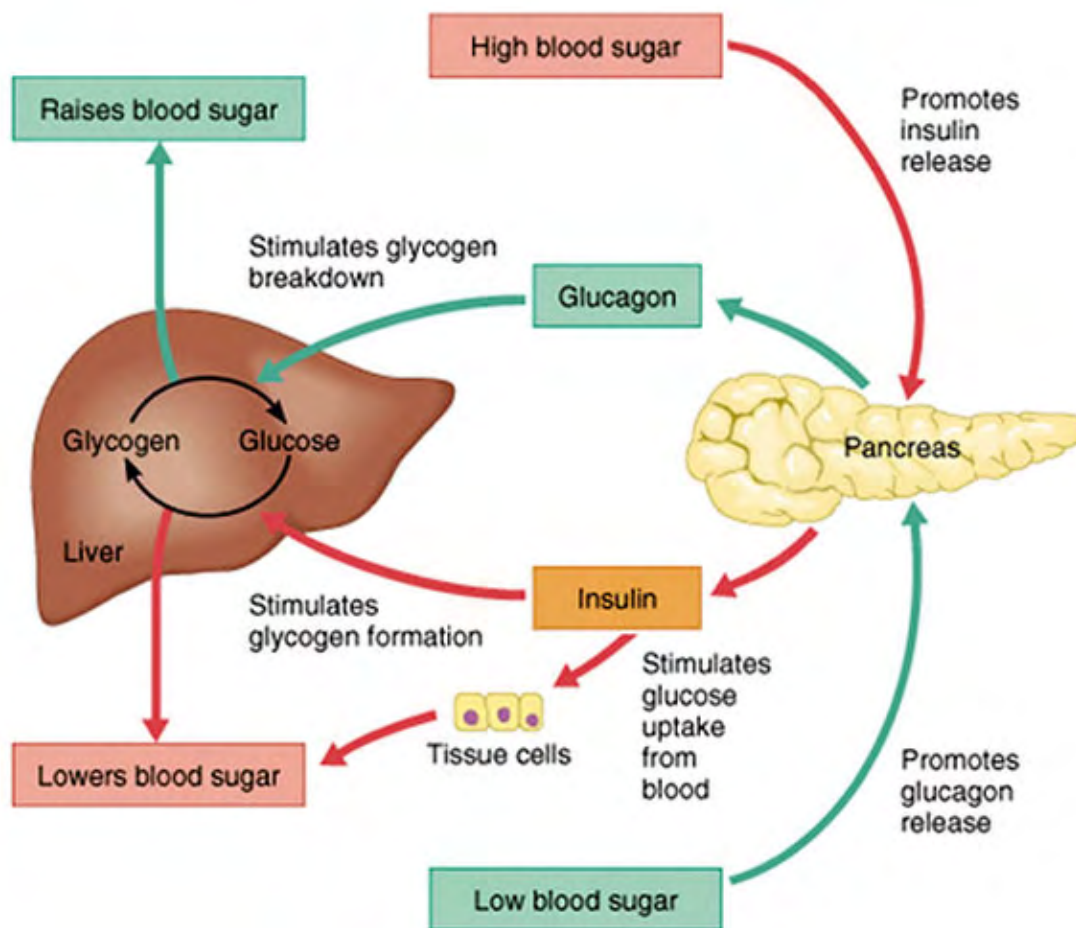
Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής.

1.1 Ρόλος ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο, το οποίο παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος και διαδραματίζει έναν πολύπλευρο ρόλο στον μεταβολισμό.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα γλυκόζης μέσα στον οργανισμό ρυθμίζονται από τις εκκρινόμενες ορμόνες της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, που είναι η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη. Η έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος διεγείρεται από τη γλυκόζη και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα. Η ινσουλίνη προσλαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ, προκαλώντας την έκκριση πολυμερών γλυκόζης από το ήπαρ. Επίσης,

το ήπαρ βοηθά στον περιορισμό της γλυκόζης στο αίμα αποθηκεύοντας την ως γλυκογόνο. Ακόμη, η ινσουλίνη ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα του ιστού. Σε αντίθεση, η απελευθέρωση της γλυκαγόνης γίνεται όταν έχουμε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στον οργανισμό προωθώντας την απελευθέρωση της αποθηκευμένης γλυκόζης.



Εικόνα 1: Ρύθμιση παραγωγής ινσουλίνης και γλυκαγόνης.

Ακόμα η ινσουλίνη επηρεάζει και τον μεταβολισμό των λιπιδίων, καθώς αυξάνει την αποθήκευση λίπους και παρεμποδίζει την κινητοποίηση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Γενικά τα όργανα ή οι ιστοί που θεωρούνται «στόχοι» της ινσουλίνης είναι το ήπαρ, οι μύες, ο λιπώδης ιστός, ο μαστός, το ενδοθήλιο των αγγείων, τα περιφερικά νεύρα κ.α. [Σμοκοβίτης 2004].

1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I

Ο διαβήτης τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος) προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και κυρίως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών. Ο όρος «ινσουλινοεξαρτώμενος» φανερώνει ότι το άτομο που πάσχει χρειάζεται χορηγούμενη ινσουλίνη για να επιβιώσει. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, η απουσία ινσουλίνης οδηγεί σε παραγωγή γλυκαγόνης σε υψηλότερα επίπεδα από τα φυσιολογικά και στην παρεμπόδιση της γλυκόζης από την είσοδο στα κύτταρα. Έτσι το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα (γι αυτό και η ονομασία «σακχαρώδης») προκαλώντας γλυκοζουρία και αυτό συμβαίνει όταν η συγκέντρωσή της στο αίμα είναι μεγαλύτερη από αυτή που μπορούν να επαναπορροφήσουν τα νεφρικά σωληνάκια. Η απεκκρινόμενη γλυκόζη συνοδεύεται από νερό οπότε οι διαβητικοί εμφανίζουν πολυουρία, πείνα, πολυδιψία κ.α.

1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», πλήττει κυρίως ενήλικες. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έξαρση της πάθησης σε άτομα νεαρής ηλικίας.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και «μη ινσουλινοεξαρτώμενος».

Ο διαβήτης τύπου II συνήθως εξελίσσεται αργά, με τα συμπτώματα και τις επιπλοκές να αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου. Συχνά δεν υπάρχουν συμπτώματα όταν γίνεται η διάγνωση του Διαβήτη Τύπου II. Η δυσκολία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων θεραπευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονυλουρίες, διγουανιδίνες

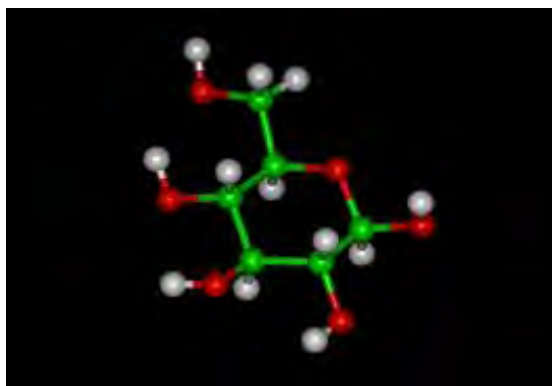
(μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης. [*Oikonomakos 2002*].

Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες [*Morral 2003*].

Υπάρχει λοιπόν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [*Oikonomakos et al., 2002*].

2. Γλυκόζη

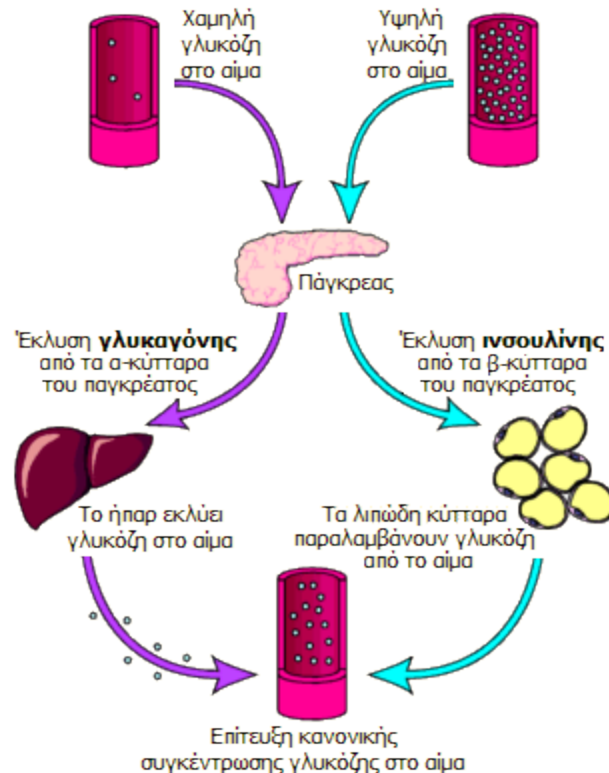
Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (**Εικόνα 2**). Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [*Stryer, 1997*].



Εικόνα 2: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων *[McArdle et al., 2000]*. Στα θηλαστικά, η γλυκόζη είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος κάτω από συνθήκες επάρκειας τροφής και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε οποιαδήποτε περίπτωση *[Stryer., 1997]*. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης *[McArdle et al., 2000]*. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη *[Stryer, 1997]*.

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης *[McArdle et al., 2000]*.



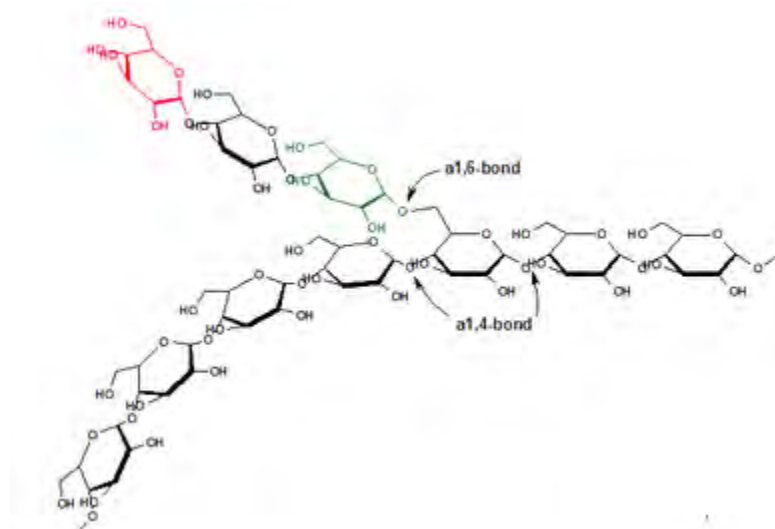
Εικόνα 3. Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη που κατευθύνεται στο ήπαρ. Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης [The important roles of insulin and glucagon: Diabetes and Hypoglycemia].

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin et al., 1990]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [McArdle et al., 2000].

3. Γλυκογόνο

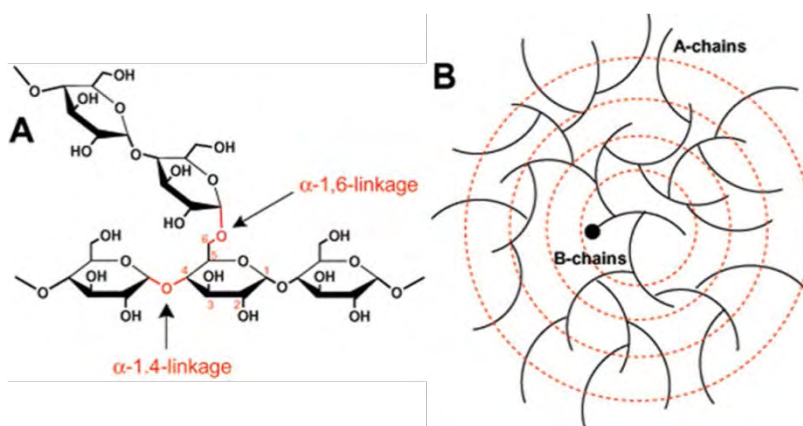
Το γλυκογόνο είναι η αποθηκεύσιμη μορφή της γλυκόζης και το πιο κοινό πολυμερές στα ζωικά κύτταρα. Υπάρχει σε αφθονία κυρίως στους μυς και το ήπαρ. Είναι ένα μεγάλο διακλαδιζόμενο πολυμερές από κατάλοιπα γλυκόζης όπου οι περισσότερες μονάδες της

γλυκόζης είναι συνδεδεμένες με γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,4. Οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,6 ανά περίπου 10 μονάδες γλυκόζης [Stryer., 1997].



Εικόνα 4: Τρισδιάστατη δομή του γλυκογόνου όπου διακρίνεται οι α -1,4 και α -1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί.

Ένα καλά αποδεκτό μοντέλο της δομής του γλυκογόνου κατηγοριοποιεί τις αλυσίδες ως εσωτερικές B-αλυσίδες, οι οποίες περιέχουν συνήθως δύο διακλαδώσεις, και εξωτερικές A-αλυσίδες, οι οποίες είναι μη διακλαδισμένες.



Εικόνα 5: Πολυμερισμός γλυκογόνου.(Α) Παρατηρείται ο πολυμερισμός α -1,4-γλυκοσιδικών δεσμών και μια διακλάδωση α -1,6-γλυκοσιδικών δεσμών. (Β) Το κλιμακωτό μοντέλο της οργάνωσης του γλυκογόνου στο οποίο οι εσωτερικές β-αλυσίδες κατά μέσο όρο φέρουν δύο διακλαδώσεις και οι εξωτερικές α-αλυσίδες δεν έχουν διακλαδώσεις [Roach P. J. et al., 2012].

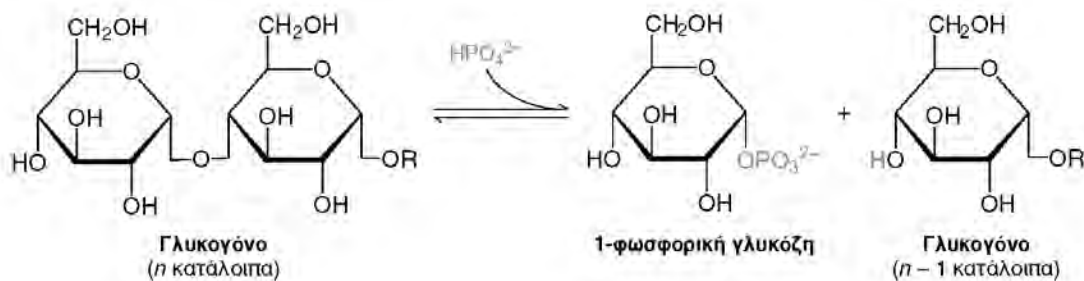
Ο άμεσος δότης γλυκόζης για την σύνθεση του γλυκογόνου είναι η ενεργοποιημένη UDP γλυκόζη. Το γλυκογόνο παράγεται από φωσφορυλίωση της UDP γλυκόζης εις βάρος της μετατροπής UTP σε UDP. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η συνθάση του γλυκογόνου είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης του γλυκογόνου σχηματίζοντας τους α-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς χρησιμοποιώντας την UDP γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλίου. Η συνθάση του γλυκογόνου στους ευκαρυώτες ενεργοποιείται αλλοστερικά από την 6-φωσφορική γλυκόζη και ρυθμίζεται αρνητικά με ομοιοπολική φωσφορυλίωση. Η παρουσία της 6-φωσφορικής γλυκόζης υπερνικά την απενεργοποίηση που οφείλεται στη φωσφορυλίωση και το ένζυμο μπορεί να επανακτήσει πλήρως την δραστηρότητα του [Roach P. J. et al., 2012].

3.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori το 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936]. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συνίσταται από τρία βήματα: την απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, την ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για να υποστεί περαιτέρω αποικοδόμηση και την μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό [Stryer., 1997].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το καθοριστικό ένζυμο στην αποδόμηση του γλυκογόνου διότι διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης, κάτι που ονομάζεται φωσφορόλυση. Η φωσφορυλάση καταλύει την διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Το Pi διασπά τον γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ C-1 του τελικού άκρου και C-4 του γειτονικού καταλοίπου. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer., 1997].





Εικόνα 6: Αποδόμηση του γλυκογόνου [Stryer., 1997].

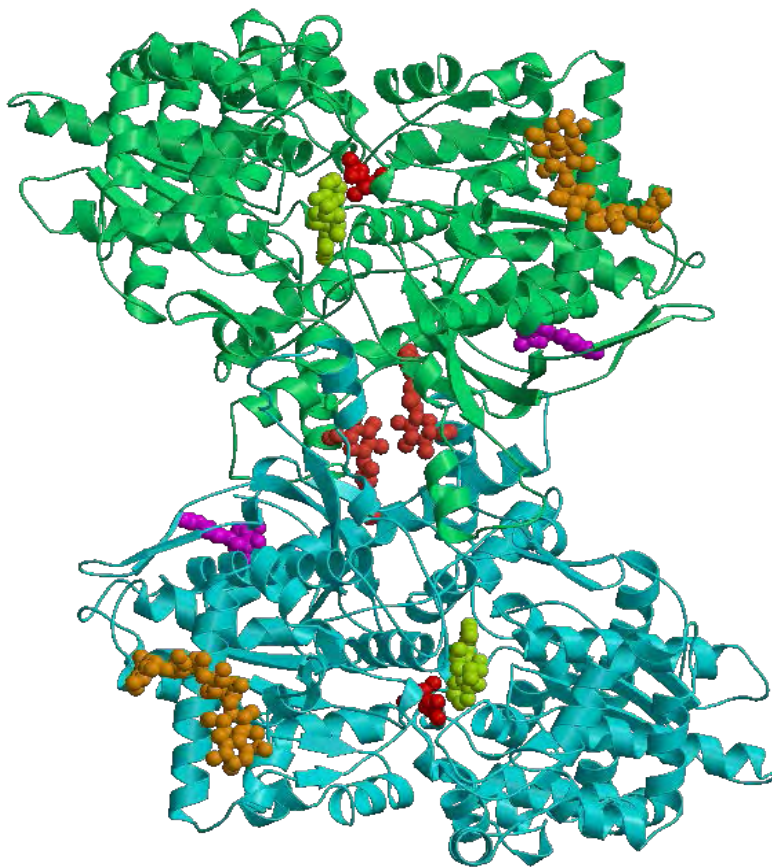
Η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι εύκολα αντιστρεπτή. Σε pH 6,8, ο λόγος ισορροπίας του ορθοφωσφορικού προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3,6. Η φωσφορόλυση προχωρά προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου in vivo. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά διότι το απελευθερωμένο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Επίσης στα κύτταρα των μυών δεν υπάρχουν μεταφορείς για την 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι φορτισμένη αρνητικά συνεπώς και δεν μπορεί να μεταφερθεί εκτός κυττάρου [Stryer., 1997].

4. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσής του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης [Stryer., 1997, Oikonomakos., 2002].

Όσον αφορά τη δομή της, η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα [Oikonomakos., 1992].



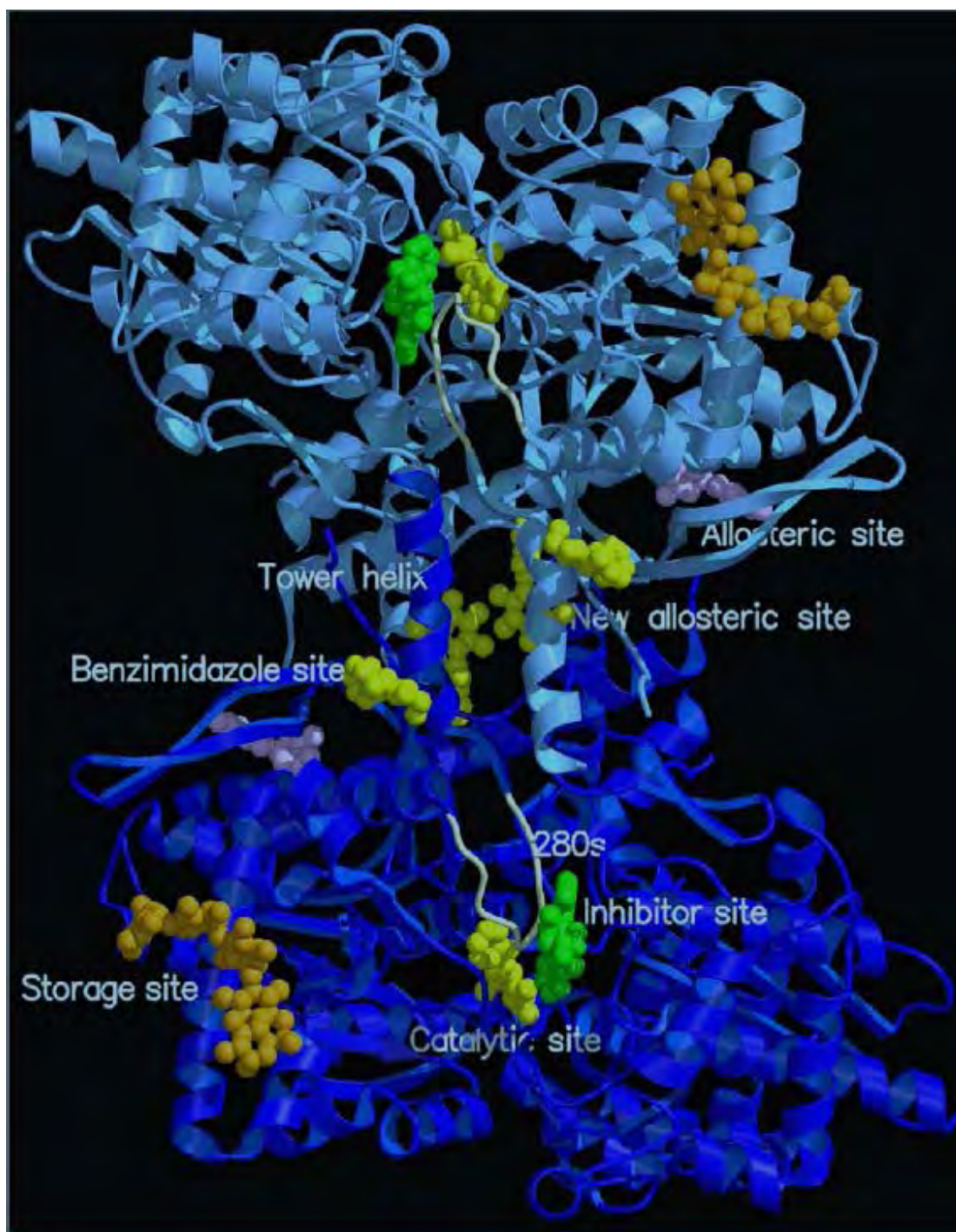
Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην α1 έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της α2 έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργου, ο βρόχος 280s και η αρχή της α8 έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της α21 έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την G1P, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της α2 και της α8 έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την α12 έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοτιδικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H_2O [McLaughlin 1984].

4.1 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

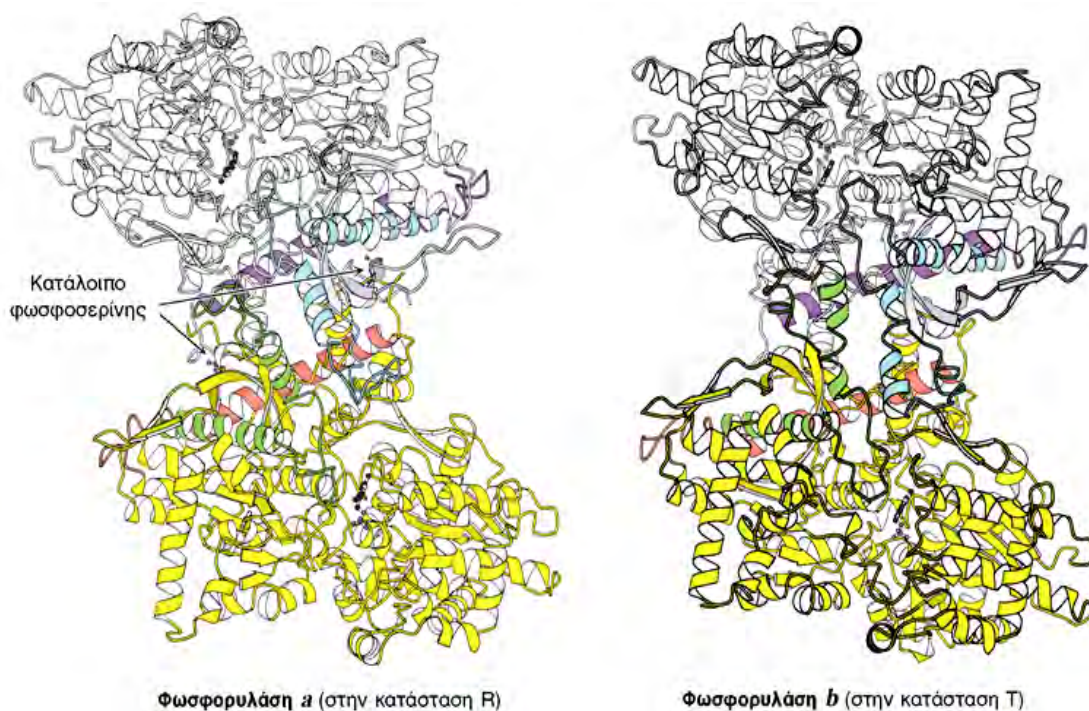
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέψιμες μορφές: την GPb όπου έχουμε χαμηλή δραστηριότητα, χαμηλή συγγένεια προς το υπόστρωμα και είναι κυρίως η T κατάσταση και την GPa όπου έχουμε υψηλή δραστηριότητα, υψηλή συγγένεια προς το υπόστρωμα και είναι κυρίως η R κατάσταση. Αλλοστερικοί ενεργοποιητές, όπως το AMP, ή αλλοστερικοί αναστολείς, όπως το ATP, η γλυκόζη και η καφεΐνη μπορούν να μεταβάλλουν την ισορροπία μεταξύ της λιγότερο ενεργής κατάστασης T και της ενεργής κατάστασης R και αντίστροφα [Monod et al., 1965].

Η γλυκόζη είναι ένας αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου η οποία σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και τον βρόγχο 280S. Έτσι, οι περισσότεροι αναστολείς για την Gpb έχουν σχεδιαστεί ώστε να μιμούνται την γλυκόζη [Oikonomakos., 2002].



Εικόνα 10: Σχηματική παρουσίαση του διμερούς της Grb. Στο σχήμα φαίνεται η θέση αποθήκευσης του γλυκογόνου (πορτοκαλί), η καταλυτική θέση (κίτρινο), ο βρόγχος 280S (λευκό) και η θέση πρόσδεσης των αναστολέων (πράσινο)

Συνεπώς, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δύο μορφές: την αποφωσφορυλιωμένη μορφή (Gpb) και την φωσφορυλιωμένη μορφή (Gba) [Oikonomakos *et al.*, 2002] όπου Gpa και Gpb διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα [Stryer., 1997]. Μετά από ορμονικά ή νευρικά σήματα, η Gpb μετατρέπεται σε Gpa μέσω της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπου έχουμε την προσθήκη μίας φωσφορικής ομάδας σε ένα απλό κατάλοιπο σερίνης (σερίνη 14) σε κάθε υπομονάδα. Η αντίστροφη αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης καταλύεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) και απενεργοποιεί το ένζυμο υδrolύοντας τον φωσφοεστερικό δεσμό. [Alemany S. and Cohen P., 1986, Bollen, M. and Stalmans, W., 1992]. Η μετάπτωση ανάμεσα στις δύο διαμορφώσεις συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. [Stryer 1997].



Εικόνα 11: Οι δομές της φωσφορυλάσης α και b. Η φωσφορυλάση α είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην ενεργή διαμόρφωση R. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. [Stryer., 1997].

5. Ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μπορεί να έχει σοβαρότατες επιπτώσεις. Η φωσφορυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του ενζύμου, σε αναστολή του ενζύμου και στη δημιουργία θέσεων αναγνώρισης άλλων πρωτεϊνών [*Johnson et al., 2001*].

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία των κινασών στην μεταγωγή σήματος ευκαρυωτικών κυττάρων και στον μεταβολισμό, υπάρχουν περισσότερες από 518 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες [*Manning G et al., 2002, Martin et al., 2009*] οι οποίες αναγνωρίζονται από μοτίβα συντηρημένων αλληλουχιών. Είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια πρωτεϊνών και αποτελούν περίπου το 1.7% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Από το σύνολο αυτό, οι 478 πρωτεϊνικές κινάσες είναι τυπικές κινάσες, ενώ οι άτυπες είναι 40. Οι τυπικές κινάσες χωρίζονται σε αυτές που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης (388 κινάσες) και σε αυτές που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης (90 κινάσες). Οι άτυπες κινάσες είναι πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκε ότι έχουν και δραστηριότητα κινάσης αλλά δεν έχουν τις συντηρημένες περιοχές που έχουν οι ευκαρυωτικές κινάσες.

5.1 Καταλυτικός μηχανισμός πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από το ATP στο υδροξύλιο των καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Η αντίδραση είναι η ακόλουθη:



Οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς μία περιοχή γύρω από την θέση φωσφορυλίωσης όπου υπάρχουν συγκεκριμένα κατάλοιπα τα οποία είναι απαραίτητα για την αναγνώριση. Οι πρωτεϊνικές κινάσες φωσφορυλιώνουν περιοχές που βρίσκονται σε λιγότερο οργανωμένα τμήματα της πρωτεΐνης που παράλληλα είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια [*Iakoucheva LM et al., 2004*]. Η προτίμηση αυτή για λιγότερο οργανωμένες περιοχές, επιτρέπει στην κινάση να τροποποιήσει την περιοχή αυτή του υποστρώματος σε μία περιοχή που ταιριάζει με την καταλυτική θέση της κινάσης [*Lowe ED et al., 1997*]. Ακόμη, επιτρέπει σε αυτές τις περιοχές να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες αφού έχουν φωσφορυλιωθεί. Σε πολλές κινάσες, η εξειδίκευση μπορεί να παρέχεται από θέσεις οι οποίες βρίσκονται σε απόσταση από το καταλυτικό κέντρο [*Jane A. Endicott et al., 2012*].

Το στάδιο μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας είναι απλό και εξαρτάται από τον σωστό προσανατολισμό των δύο υποστρωμάτων δηλαδή του ATP και της υδροξυλομάδας της σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης που θα φωσφορυλιωθεί. Κατά τον μηχανισμό αυτό, το OH της σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης έρχεται απέναντι από την μεταφερόμενη φωσφορική ομάδα [*Madhusudan., 2002*].

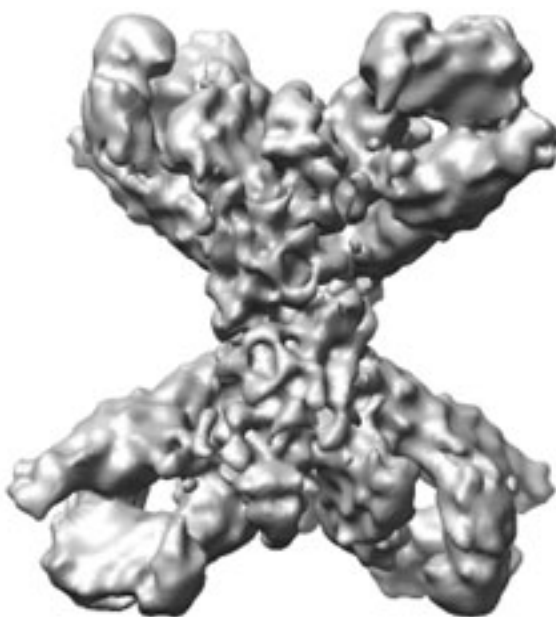
5.2 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η μυϊκή κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση η οποία αναγνωρίστηκε από την δράση της και ξεκίνησαν οι διαδικασίες καθαρισμού της, περίπου πριν από 50 χρόνια [*Fischer and Krebs, 1955; Krebs et al., 1964*].

Η PhK αποτελεί ένα βασικό ένζυμο που εμπλέκεται στον έλεγχο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου [*Lowe et al., 1997*]. Οι ενδοκυτταρικές αποθήκες γλυκογόνου χρησιμοποιούνται κυρίως για την διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα κατά τη διάρκεια της νηστείας αλλά και ως πηγή ενέργειας για την μυϊκή σύσπαση. Η PhK ανταποκρίνεται σε σήματα από διαφορετικά μονοπάτια – ορμονικά σήματα (αδρεναλίνη), νευρικά ερεθίσματα (Ca_2^+) και μεταβολικά σήματα (επίπεδα ADP)– έτσι ώστε να έχουμε μία κινητοποίηση των αποθηκών γλυκογόνου χρησιμοποιώντας ως μεσολαβητή το ασβέστιο [*Lowe et al., 1997*]. Ακόμη, μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω της προτεόλυσης και της αλλαγής του pH [*Walsh et al., 1986*].

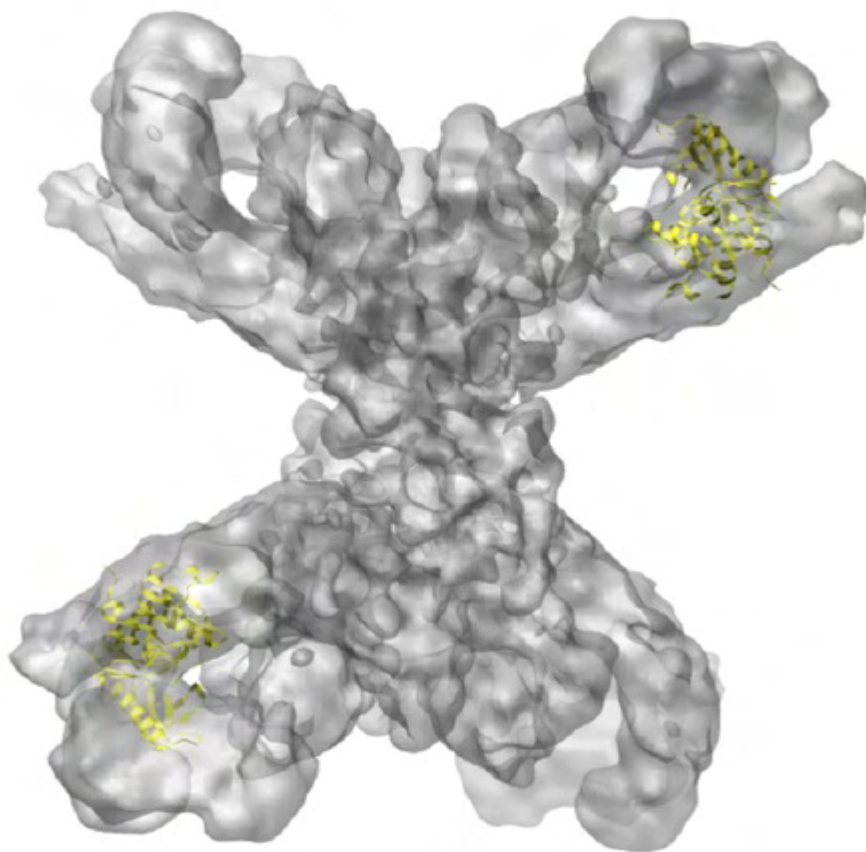
5.2.1 Δομή PhK

Η PhK είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο σύνθετες πρωτεϊνικές κινάσες [*Brushia & Walsh; 1999 Heilmeyer, 1991*]. Αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχειομετρία $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ και συνολικό μοριακό βάρος $1.3 \cdot 10^6$ Da.



Εικόνα 12: Η δομή της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Η α υπομονάδα έχει μοριακό βάρος 138 kDa και αποτελείται από 1237 αμινοξέα ενώ η β έχει μοριακό βάρος 125 kDa και 1092 αμινοξέα. Οι α και β είναι ομόλογες υπομονάδες και είναι στόχοι φωσφορυλίωσης [Lowe *et al.*, 1997]. Η αυτοφωσφορυλίωση ή η φωσφορυλίωση αυτών των υπομονάδων είναι αποτέλεσμα ορμονικών σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση της κινάσης. Το ADP συνδέεται με υψηλή συγγένεια στην υπομονάδα β και αυξάνει την δραστικότητα [Bryan *et al.*, 2008]. Η νευρική διέγερση πραγματοποιείται από ιόντα Ca^{2+} , τα οποία συνδέονται με την υπομονάδα δ που έχει μοριακό βάρος 16,7 kDa και αποτελείται από 148 αμινοξέα. Με την σύζευξη αυτή έχουμε σύσπαση των μυών με παράλληλη παραγωγή ενέργειας. Η υπομονάδα δ είναι πανομοιότυπη με την καλμοδουλίνη και έχει ευαισθησία στο ασβεστόιο [Lowe *et al.*, 1997]. Η PhK διαφέρει από όλες τις άλλες κινάσες οι οποίες ρυθμίζονται από την καλμοδουλίνη στο ότι η υπομονάδα δ συνδέεται στενά με το ολοένζυμο απουσία ασβεστίου [Bryan *et al.*, 2008]. Η υπομονάδα γ έχει μοριακό βάρος 44,7 kDa και είναι η καταλυτική υπομονάδα. Αποτελείται από μία περιοχή με δράση κινάσης και μία περιοχή που ρυθμίζεται από την σύνδεση της καλμοδουλίνης η οποία είναι και αυτοανασταλούμενη.

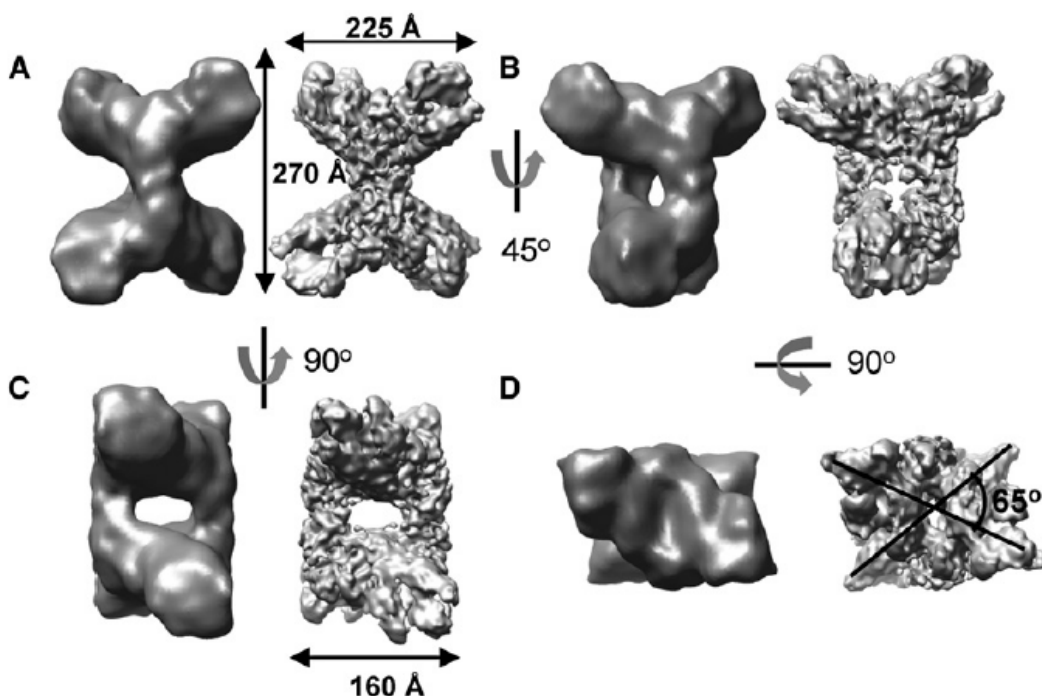


Εικόνα 13: Τρισδιάστατη απεικόνιση της PhK όπου με κίτρινο φαίνεται η τοποθεσία της γ υπομονάδας [Catherine Venien-Bryan *et al.*, 2008].

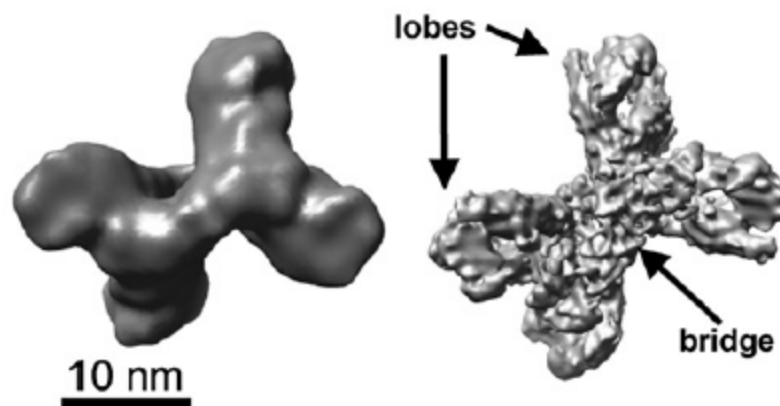
Η PhK είναι μία από τις πολλές κινάσες οι οποίες δεν απαιτούν την φωσφορυλίωση στο κέντρο ενεργοποίησης για να ενεργοποιηθούν [Lowe et al., 1997, Owen et al., 1995]. Έτσι, ο ρόλος των ρυθμιστικών υπομονάδων α , β , δ είναι να συγκρατούν την ενεργότητα της κινάσης έως ότου έρθουν σήματα τα οποία άρουν την αναστολή [Bryan et al., 2008].

5.2.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες για την PhK

Η δομή της κινάσης της φωσφορυλάσης έχει προσδιοριστεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία με ευκρίνεια 22Å και μοιάζει με πεταλούδα με δύο λοβούς-φτερά τα οποία ενώνονται με δύο λοξές γέφυρες. Οι δύο λοβοί συνδέονται με μία άρθρωση ανάμεσα στην Lys108 και στην Gly109. Από την **Εικόνα 14** παρατηρούμε ότι οι γέφυρες που ενώνουν τους λοβούς αποτελούνται κατά μεγάλο ποσοστό από την β υπομονάδα [Venien-Bryan et al., 2002].



Εικόνα 14: Α) Η μπροστινή όψη που μοιάζει με πεταλούδα. Β) Περιστροφή 45 μοιρών στον κατακόρυφο άξονα από την όψη της πεταλούδας. Γ) Περιστροφή 90 μοιρών στον κατακόρυφο άξονα από την όψη της πεταλούδας. Δ) 90 μοίρες περιστροφή στον οριζόντιο άξονα από την πεταλούδα όπου φαίνεται η γωνία περιστροφής μεταξύ των δύο λοβών [Venien-Bryan et al., 2002].



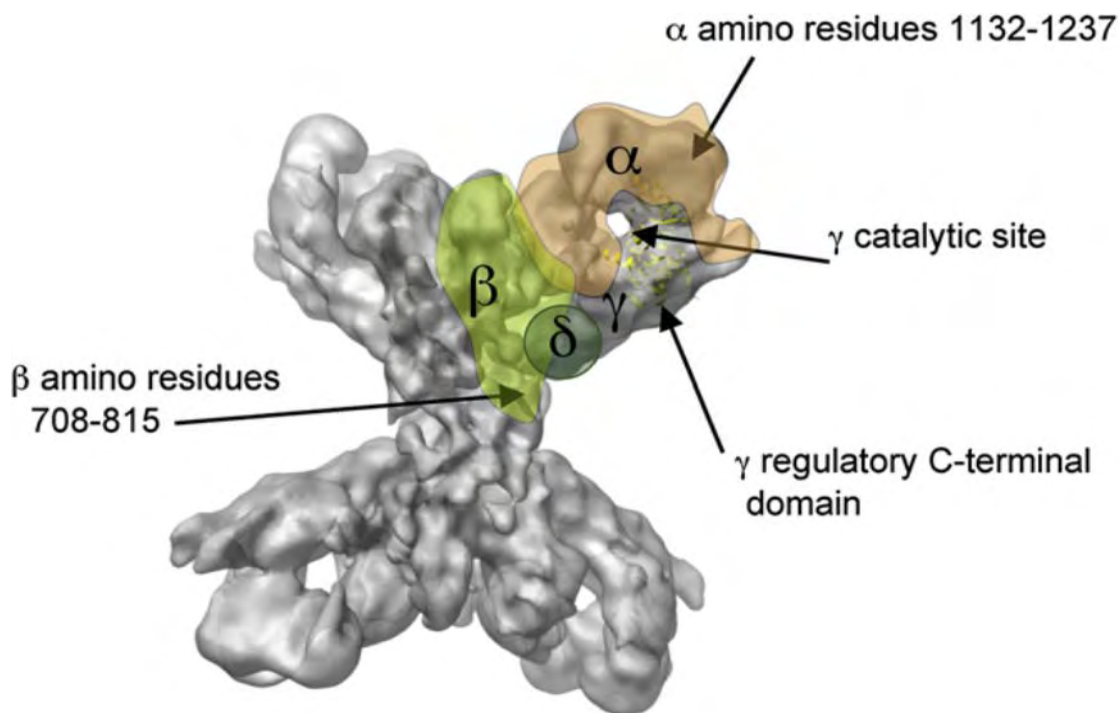
Εικόνα 15: Πλάγια όψη όπου φαίνονται οι λοβοί και η γέφυρα [Venien-Bryan et al., 2002].

Η δομή της PhK έχει προσδιοριστεί σε ευκρίνεια 28 Å παρουσία GPb, Ca^{2+} και Mg^{2+} με pH 8.2, και φάνηκε ότι η GPb προσδένεται στο άκρο των λοβών [Venien-Bryan et al., 2002]. Παράλληλα, ο Nadeau και η ομάδα του το 2002 συνέκριναν την ανενεργή PhK σε pH 6.8 παρουσία και απουσία ασβεστίου και φάνηκε ότι το ασβέστιο προωθεί μια ανακατανομή της πυκνότητας στο λοβό και στην γέφυρα χωρίς να διαταράσσει τις συνολικές διαστάσεις.

5.2.3 Σημασία υπομονάδων PhK

Η υπομονάδα α είναι η πιο ευαίσθητη σε σχέση με τις υπόλοιπες σε πρωτεόλυση από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεασών [Trempe και Carlson, 1987]. Εκτιμάται ότι υπάρχει μεγάλη επιφάνεια της υπομονάδας που είναι εκτεθειμένη και είναι πολύ πιθανό οι εξωτερικοί λοβοί να συντίθενται από την υπομονάδα α. Αυτό στηρίζεται σε δύο διαπιστώσεις: (I) Η θέση των επίτοπων για τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της υπομονάδας α (κατάλοιπα 1132-1237) βρίσκονται στην κορυφή των λοβών της κινάσης [Wilkinson et al., 1994]. (II) Διασταυρούμενα πειράματα σύνδεσης όπου χρησιμοποιήθηκε τρανσγλουταμινάση έχουν δείξει ότι οι μικρές ποσότητες αα διμερων σχηματίζονται όταν η PhK είναι ενεργή. Τα αα διμερή δεν παρατηρούνται όταν η κινάση είναι ανενεργή [Nadeau και Carlson, 1994]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η α υπομονάδα εκτείνεται από την άκρη του λοβού σε μία πιο κεντρική τοποθεσία. Υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της α και των άλλων υπομονάδων [Nadeau et al., 1998]. Πειράματα έδειξαν ότι η C τερματική περιοχή της υπομονάδας α (κατάλοιπα 1060-1237) αλληλεπιδρά με την υπομονάδα γ [Nadeau et al., 1999], και υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των καταλοίπων 724 και 981 της α-υπομονάδας και της C-τερματικής περιοχής της υπομονάδας γ [Harris et al., 1990].

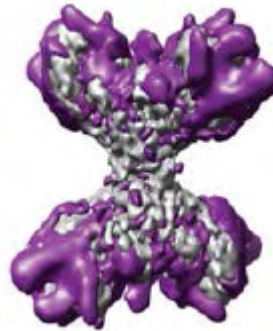
Ο ρόλος της υπομονάδας β είναι πολύ σημαντικός για τον σχηματισμό της τεταρτοταγούς δομής της PhK και αυτό υποστηρίζεται από διάφορα δεδομένα. (I) Ένας επίτοπος στην υπομονάδα β (κατάλοιπα 708-815) εντοπίζεται σε μία εσωτερική θέση των λοβών κοντά στα σημεία που συνδέονται οι γέφυρες [Wilkinson *et al.*, 1997]. (II) Η επιλεκτική πρωτεόλυση της υπομονάδας α δεν καταστρέφει τις γέφυρες, ενώ η πρωτεόλυση των υπομονάδων α και β προωθεί τον σχηματισμό ενός ενιαίου λοβού δίχως γέφυρες [Trempe *et al.*, 1986]. (III) Ένα τριμερές αγδ υπομονάδων έχει παραχθεί με την χρήση του Li-Br ως μεσολαβητή για την κατακρήμνιση της υπομονάδας β του ολοενζύμου [Pickett- Gies και Walsh, 1985; Wilkinson *et al.*, 1997]. Το σύμπλοκο αγδ στερείται της γέφυρας, όπως παρατηρείται και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [Trempe *et al.*, 1986]. (IV) Υπάρχουν δύο γέφυρες, αλλά τέσσερις υπομονάδες β , υποδηλώνοντας την εμφάνιση διμερισμού β/β κατά την εσωτερική γεφύρωση των λοβών [Ayers *et al.*, 1998]. Όλα τα παραπάνω δεδομένα συμβαδίζουν με το σχήμα της **Εικόνας 16**.



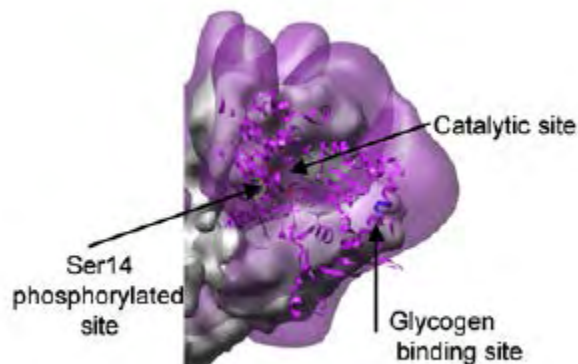
Εικόνα 16: Σχηματική τοποθέτηση των τεσσάρων υπομονάδων στην 3D απεικόνιση της PhK [Venien-Bryan *et al.*, 2008]

5.2.4 Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου PhK/Gpb

Αρχικά το σύμπλεγμα PhK/Gpb δημιουργήθηκε μέσα σε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε δισθενή κατιόντα Mg^{2+} και Ca^{2+} καθώς αυτά αυξάνουν την συγγένεια μεταξύ PhK και GPb [Xu *et al.*, 1996].



Εικόνα 17: 3D απεικόνιση με ηλεκτρονική μικροσκοπία της PhK (γκρι) και της GPb (μωβ) σε ευκρίνεια 9.9Å [Venien-Bryan *et al.*, 2008].



Εικόνα 18: 3D απεικόνιση της PhK (γκρι) και της GPb (μωβ) σε ευκρίνεια 9.9Å με ηλεκτρονική μικροσκοπία όπου παρατηρούμε τη σερίνη 14 στην N-τελική περιοχή (πράσινο), την περιοχή πρόσδεσης του γλυκογόνου (μπλε) και την καταλυτική περιοχή (κόκκινο) [Venien-Bryan *et al.*, 2008].

5.2.5 Ενεργοποίηση της PhK

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι εύκαμπτες για να μπορούν να αναδιπλωθούν και να μεταβούν από την ενεργή στην ανενεργή κατάσταση και αντίστροφα, από συγκεκριμένες περιοχές ή ξεχωριστές υπομονάδες. Η PhK είναι μία κινάση η οποία ενεργοποιείται από το AMP και παίζει ομοιοστατικό ρόλο στα κύτταρα των θηλαστικών καθώς διατηρεί τα επίπεδα του ATP [*Steinberg GR., 2009*].

Η ενεργοποίηση της PhK είναι πολύπλοκη με αρκετά διαφορετικά στρώματα ελέγχου. Αν και *in vivo* το μόνο υπόστρωμα της PhK είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, *in vitro* η PhK φωσφορυλιώνει με μικρότερη δραστηριότητα την συνθάση του γλυκογόνου, την τροπονίνη I, την τροπονίνη T, τις υπομονάδες α και β της PhK και αρκετές άλλες πρωτεΐνες [*Pickett - Gies και Walsh, 1986*]. *In vitro*, το pH είναι ένας περαιτέρω ρυθμιστής.

Στον μυ και στο ήπαρ, η PhK καταλύει την ασβεστιο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της ανενεργής φωσφορυλάσης b στην ενεργή φωσφορυλάση a. Το σημείο φωσφορυλίωσης της φωσφορυλάσης b είναι η σερίνη 14 [*E.D.Lowe et al., 1997*]. Η ενεργή φωσφορυλάση καταλύει την φωσφορυλίωση του γλυκογόνου και την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης [*Catherine Venien-Bryan et al., 2008*]. Έχει αναλυθεί η αλληλουχία γύρω από το «κρίσιμο σημείο» και έχει βρεθεί η εξής διάταξη:



Όπου X και Y είναι τυχαία αμινοξέα [*Pearson and Kemp., 1991*]. Η δραστηριότητα αυξάνει όταν όταν το Y είναι αργινίνη, κάτι που συμβαίνει στη φωσφορυλάση [*Graves, 1983*].

Η ανενεργή PhK προσδιορίστηκε παρουσία ασβεστίου και φάνηκε πως έχει μικρή δραστηριότητα σε pH 6.8. Η δραστηριότητα αυξήθηκε κατά πολύ όταν το pH έφτασε το 8.2 άλλα και πάλι η παρουσία ασβεστίου ήταν απαραίτητη. Η ενεργοποίηση της PhK με φωσφορυλίωση ή με μειωμένη πρωτεόλυση οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας σε pH 6.8, αλλά παρατηρείται μικρή αλλαγή στο δραστηριότητα σε pH 8.2 [*Newsholme και Walsh, 1992*].

6. Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως στόχος εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου II [*Oikonomakos., 2002*]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης και της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καθώς είναι ένζυμα

κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν στραφεί προς την ανακάλυψη φυσικών αναστολέων και όχι χημικών. Πιο συγκεκριμένα, η έρευνα έχει προχωρήσει προς την απομόνωση ουσιών οι οποίες λειτουργούν ως αναστολείς της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η αναστολή της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προκαλεί την αναστολή της φωσφορυλίωσης της Grb στην σερίνη 14 συνεπώς δεν έχουμε την ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης. Η μη ενεργοποιημένη φωσφορυλάση δεν μεταβολίζει το αποθηκευμένο γλυκογόνο άρα δεν συμβαίνει η απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο αίμα. Με τα παραπάνω δεσμομένα συμπεραίνουμε πως ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον όσον αφορά την θεραπεία του διαβήτη.

Η υψηλή δραστικότητα που εμφανίζει η υπομονάδα γ της κινάσης την κάνει έναν σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων για τον έλεγχο του μεταβολισμού της γλυκόζης. Έτσι, η αναστολή της θέσης σύνδεσης του ATP είναι μία ελκυστική προσέγγιση για την ρύθμιση του γλυκογόνου [*E.D.Lowe., 1997*]. Οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν εξελιχθεί σε σημαντικούς στόχους για θεραπείες και η λύση της δομής της πρωτεϊνικής κινάσης θα έχει ένα τεράστιο αντίκτυπο στην ανάπτυξη επιλεκτικής και στοχευμένης θεραπείας [*Jane A. Endicott et al., 2012*].

7. Κουρκουμίνες

Η κούρκουμα είναι ένα από τα πιο πολύτιμα και συχνά χρησιμοποιούμενα μπαχαρικά στην ινδική και την ταϊλανδέζικη κουζίνα εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η κουρκουμίνη είναι ένα συστατικό της κούρκουμας αλλά έχει τις δικές του ιδιότητες. Η κουρκουμίνη είναι μία φυτοχημική ουσία και ανήκει σε μία κατηγορία χημικών ενώσεων που είναι γνωστή ως κουρκουμινοειδή. Εκτός από το να είναι ένα σημαντικό συστατικό της κούρκουμας, η κουρκουμίνη είναι μία τριτερπενοειδής ένωση που παρέχει μεγάλο όφελος για την υγεία. Η επιστημονική ονομασία του είναι *Curcuma longa* και έχει μια ζεστή πικρή/πικάντικη και γήινη γεύση που μοιάζει με του τζίντζερ. Παρασκευάζεται από την αποξηραμένη ρίζα του φυτού της κούρκουμας όπου η ρίζα χρησιμοποιείται για διάφορους θεραπευτικούς σκοπούς. Η κούρκουμα είναι ένα πολυετές φυτό που προέρχεται από την Ινδία και βρίσκεται στη Νότια και στην Απω Ανατολή, γι αυτό και μία άλλη ονομασία του είναι «ινδικό σαφράν». Οι αναστολείς οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα προέρχονται από τον Dr. Alberto Minassi του Πανεπιστημίου Piemonte Orientale της Φαρμακευτικής σχολής που εδράζεται στην Νοβάρα της Ιταλίας.



Εικόνα 19: Η κουρκουμίνη και το κίτρινο χαρακτηριστικό της χρώμα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [*Melpidou and Oikonomakos, 1983*].

Υλικά:

- Κουνέλια (2 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO_3),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N

- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO_3 και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα [50:50:1] (50mM β-φωσφογλυκερόλη, 50mM μερκαπταιθανόλη, 1mM EDTA, pH 6.8)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πορεία απομόνωσης:

Βήμα 1^ο : Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 2 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες

με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2° : Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3° : Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4° : Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται.

Βήμα 5° : Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της

φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για το ελάχιστο χρονικό διάστημα των 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6° : Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

2. Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli:

▪ Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων (competent cells) με πλασμιδιακό φορέα

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους B834(DE3) με πλασμιδιακό φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (γ-PhK), με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Το γονίδιο του ενζύμου είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P-1 (Amersham GE) ο οποίος είναι εφοδιασμένος εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (GST) μέσω του πρωτεολυτικού κέντρου (LEVLFQGP) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση Rhinovirus 3X (PreScission Protease). Στο σωληνάριο τύπου eppendorf όπου ήταν αποθηκευμένα τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 50μg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και αναδεύονται πολύ ήπια και αφήνονται για επώαση στους 4°C για 30min. Ακολούθως, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 42°C για 45sec ακριβώς. Στη συνέχεια,

μεταφέρονται για επώαση στους 4°C για 2min. Μετά το πέρας των 2 λεπτών τοποθετείται 1ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, άνευ αντιβιοτικού. Τα μετασχηματισμένα, πλέον, βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (180-210 rpm) για 1h. Μετά το πέρας της επώασης το 1/500 του αρχικού όγκου της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό αμικιλίνη (αντιβιοτικό διαλογής των μετασχηματισμένων μόνο κυττάρων με το γονίδιο της σε τελική συγκέντρωσης 50μg/ml με γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur) Τα τρυβλία επωάζονται για 16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C. Σημειώνεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν μεταχείριση βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες

▪ **Υπερέκφραση καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ-PhK) σε βακτήρια *E.coli* B834(DE3)**

Κατά την πορεία έκφρασης και απομόνωσης μιας πρωτεΐνης, τα βασικά σημεία που πρέπει να καθοριστούν πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα είναι:

1. Οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θερμοκρασία, αερισμός, θρεπτικό υλικό, διάρκεια επώασης)
2. Η συγκέντρωση IPTG που απαιτείται κατά την επαγωγή καθώς επίσης και θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η επαγωγή.

Επίσης πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, γίνεται διερεύνηση ως προς τον εντοπισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο κλάσμα, καθώς επίσης και αν αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά συστατικά.

Για την επαγωγή της έκφρασης της γ-Phk χρησιμοποιήθηκε σαν επαγωγέας η ένωση IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης) διότι εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη και επιπλέον μιας και δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου, δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή.

Πειραματική διαδικασία:

1. Λαμβάνεται μια μονή αποικία των επιθυμητών κυττάρων από φρέσκο τρυβλίο που αποθηκεύεται στους 4 °C και εμβολιάζεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού LB στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό αμπικιλίνη ($c=50\mu\text{g/ml}$) σε στείρες συνθήκες.
2. Η μικρή καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C ολονύκτια, υπό ανάδευση στις 210 rpm.
3. Η μικρή καλλιέργεια αραιώνεται 1:100 σε κατάλληλη ποσότητα LB/ αντιβιοτικού Amp ($c=50\mu\text{g/ml}$), σε 1L και επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση στις 210 rpm. Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1ml καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι οπτικής απορρόφησης $OD_{600\text{nm}} = 0.5-0.6$, όπου και θεωρείται, για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Είναι επιθυμητό, η καλλιέργεια να φτάσει στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης όπου και θα ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης.
4. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG ($C=0.1\text{mM}$) και η καλλιέργεια επωάζεται ολονύκτια στους 18° C υπό ανάδευση στις 210 rpm.

Συλλογή των κυττάρων

Οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρικό ίζημα είτε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε μεγάλες ταχύτητες. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μαζί με το θρεπτικό υλικό, ενώ οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυτταρικές εντοπίζονται στο κυτταρικό ίζημα.

Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε δοχεία φυγοκέντρησης και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται σε 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο το οποίο θα πρέπει να είναι διαυγές (αν δεν είναι διαυγές επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση διότι αυτό σημαίνει ότι δεν έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα), και το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί στους -20 °C .

Λύση των κυττάρων

Η λύση των κυττάρων είναι ένα κρίσιμο βήμα στη πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης καθώς μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική της ενεργότητα και τη συνολική της ποσότητα. Η λύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με την εφαρμογή οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο μηχανικός τρόπος λύσης των κυττάρων με χρήση υπερήχων και η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται απο

- 50mM Tris (pH 7.5)
- 200 mM NaCl
- 0.1% MTG (1-thioglycerol)
- Αναστολείς πρωτεασών (Complete tablets, EDTA – free)
- 50U βενζονάση

2. Διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων (pellet) στο διάλυμα λύσης σε θερμοκρασία 0°C.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4°C , για 1h στις 15000g

2.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός της καταλυτικής υπομονάδας γ της κινάσης της φωσφορυλασης.

A. Χρωματογραφία συγγένειας:

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μια αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμων. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, η οποία στα ένζυμα εκφράζεται με την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-δεσμευτές (ligand). Αν κάποιος δεσμευτής, π.χ. ενζυμικό υπόστρωμα, αναστολέας, συνένζυμο, αντίσωμα, μέταλλο κ.α., δεσμευθεί χημικά (ακινητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό, το οποίο αποκαλείται φορέας, τότε λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας (affinity adsorbent).

Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της γ-PhK ήταν η Protino GST/4B (Macherey-Magel) που φέρει ως δεσμευτή (ligand) ακινητοποιημένη γλουταθειόνη.

Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης.

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50mM KH_2PO_4 (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον δεσμευτή διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50mM KH_2PO_4 (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl
- 20mM ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά κλάσματα ενώνονται και ακολουθεί πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου της GST με την έγχυση διαλύματος GST-3C πρωτεάσης σε αναλογία 1/20 w/w με επώαση για 24 h στους 4°C.

B. Χρωματογραφία συγγένειας:

Η δεύτερη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της γ -PhK ήταν η HiTrapBlueHP (GEHealthcare) που φέρει ως δεσμευτή (ligand) τον Cibacron™ BlueF3G-A.

Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη Cibacron περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης.

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50mM KH_2PO_4 (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 50mMNaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον δεσμευτή διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50mM KH_2PO_4 (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 1M NaCl

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

Γ. Χρωματογραφία συγγένειας:

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα καθарίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης ProtinoGST/4B (Macherey-Magel). Η διαδικασία καθαρισμού διαφέρει από το πρώτο βήμα καθαρισμού καθώς η γ -Phk δεν θα δεσμευθεί στη στήλη εφόσον έχει γίνει η πρωετολυτική διάσπαση του επίτοπου της GST. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50mM KH_2PO_4 (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον δεσμευτή διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.. Στην στήλη θα δεσμευτεί η GST-3C καθώς και η GST.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη συνεπώς και της πρωτεΐνης μας.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50mM KH_2PO_4 (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl
- 20Mm ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm.

6. Η πρωτεΐνη που συλλέξαμε αποθηκεύεται στους -20°C αφού προστεθεί 50% γλυκερόλη.

3. Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας PhK γίνεται έμμεσα και στηρίζεται στη μέτρηση της ειδικής δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.

4. Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος.

Υλικά:

- Stop Buffer (pH 6.8):
 - 0,1M TEA
 - 1mM EDTA
 - 2mM DTT
- Buffer αραίωσης κινάσης:
 - 5mg/ml BSA
 - 50mM Tris
 - 50mM Hepes
 - 0,5mM CaCl_2
 - 10mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ με pH 8.2
- Buffer Hepes:
 - 50mM Tris
 - 50mM Hepes
 - 0,5mM CaCl_2
 - 2mM DTT

10mM (CH₃COO)₂Mg

- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (β-GP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)
- Απιονισμένο ύδωρ

Όργανα:

- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- pHμετρο
- Χρονόμετρο

Εκτέλεση πειράματος

4.1 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της γ-PhK ως προς ATP

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο όπου η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 30° C. Ο συνολικός όγκος των υποστρωμάτων ήταν 90μL και περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και διάφορες συγκεντρώσεις ATP. Τοποθετούνται τα υποστρώματα για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10μL διαλύματος γ-Phk. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 50mM Tris/HCl pH 8.2, 50 mM Hepes, 0.5mM CaCl₂, 2mM DTT, 10mM (CH₃COO)₂Mg, 0.5mg/ml BSA, 1mg/ml Gpb, ATP (0.08mM- 0.2 mM- 0.4mM- 0.5 mM- 0.8 mM) και γ-PhK 5ng/ml.

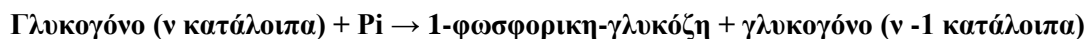
	Eppendorf 1	Eppendorf 2	Eppendorf 3	Eppendorf 4	Eppendorf 5
ATP(4mM)	0,08mM (2μL)	0,2mM (5μL)	0,4mM (10μL)	0,5mM (12,5μL)	0,8mM (20μL)
Hepes buffer (4x)	25μL	25μL	25μL	25μL	25μL
H ₂ O	53μL	50μL	45μL	42,5μL	35μL
Gpb(10mg/ml)	10μL	10μL	10μL	10μL	10μL
γ-PhK (50ng/ml)	10μL	10μL	10μL	10μL	10μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL

Πίνακας 1: Συνθήκες αντίδρασης προσδιορισμού δραστικότητας PhK ως προς ATP

Σε χρονικά διαστήματα 4min- 8min- 12min-14min, λαμβάνονται δείγματα 20μL απο την ενζυμική αντίδραση και αραιώνονται 50 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα (Stop buffer) το οποίο περιέχει 100mM TEA/HCl pH 6.8, 1mM EDTA, 2mM DTT, σε θερμοκρασία 0°C ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ενζυμική δραστικότητα της Gra που είναι το προϊόν της αντίδρασης της γ-PhK.

4.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας της GPa

Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστικότητας της Gra. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C. Αρχικά ετοιμάζονται τα υποστρώματα της αντίδρασης που περιέχουν 152mM G1P, 2% γλυκογόνο, 20μM AMP, και 1mM καφεΐνη και τελικό όγκο 0.15mL. Τοποθετούνται τα υποστρώματα για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0.15mL Gra 0.02mg/ml (προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης), στα υποστρώματα. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση (σε τελικό όγκο 0.3mL) έχουμε: 76mM G1P, γλυκογόνο 1%, 10μM AMP, 0.5mM καφεΐνη.

	Eppendorf
AMP (1mM)	3μL
G1P (400mM)	57μL
H ₂ O	45μL
Γλυκογόνο (10%)	30μL
Καφεΐνη (10mM)	15μL
Τελικός όγκος	150μL

Πίνακας 2 Συνθήκες αντίδρασης προσδιορισμού δραστηριότητας Gra.

Μετά απο χρόνο αντίδρασης 4min λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 300μL SDS 1% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω προσθέτοντας 5mL διαλύματος ασκορβικού οξέος σε κάθε δείγμα. Μετά απο 15min επώαση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 850nm. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά

ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 10M.
 - Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10M.
- Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Παρασκευή τυφλών

Παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

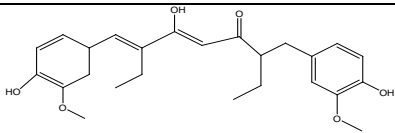
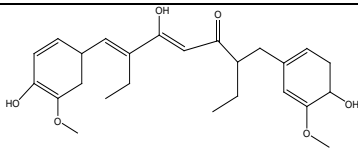
- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

5. Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέων

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής [Segel, 1975]. Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.

Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος ATP.

Στην παρούσα διπλωματική εξετάστηκαν δύο αναστολείς, με την κωδική ονομασία CD944 και ο MIG242. Στον πίνακα ακολουθούν οι δομές των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC_{50} .

	CD944	MIG242
ΔΟΜΕΣ		
Συγκέντρωση ATP	0,1μM	0,1μM
Συγκεντρώσεις αναστολέων	0,1mM	0,1mM
	0,3mM	0,2mM
	0,5mM	0,3mM
	0,7mM	0,4mM
	1mM	0,8mM

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της IC_{50} .

Παρασκευάζονται διαλύματα υποστρωμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC_{50} , και σταθερή συγκέντρωση ATP 0.1μM. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα. Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις είναι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν στις ενότητες 4.1, 4.2.

	Control	Eppendorf 1	Eppendorf 2	Eppendorf 3	Eppendorf 4	Eppendorf 5
ATP	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM
Hepes	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM
H ₂ O	33,9μL	33,9μL(- XμL)	33,9μL(- YμL)	33,9μL(- ZμL)	33,9μL(- ΩμL)	33,9μL(- ΝμL)
Gpb	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml
Αναστολέας	-	0,1mM (XμL)	0,3mM (YμL)	0,5mM (ZμL)	0,7mM (ΩμL)	1mM (ΝμL)
Τελικός όγκος αντίδρασης	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις υποστρωμάτων κατά τον προσδιορισμό της IC₅₀ του αναστολέα **CD944**.

	Control	Eppendorf 1	Eppendorf 2	Eppendorf 3	Eppendorf 4	Eppendorf 5
ATP	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM
Hepes	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM
H ₂ O	33,9μL	33,9μL(- XμL)	33,9μL(- YμL)	33,9μL(- ZμL)	33,9μL(- ΩμL)	33,9μL(- ΝμL)
Gpb	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml
Αναστολέας	-	0,1mM (XμL)	0,2mM (YμL)	0,3mM (ZμL)	0,4mM (ΩμL)	0,8mM (ΝμL)
Τελικός όγκος (μετά την προσθήκη PhK)	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις υποστρωμάτων κατά τον προσδιορισμό της IC₅₀ του αναστολέα **MIG242**.

6. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τις εξισώσεις

A) Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας (specific activity) της Gp

$$\text{specific activity Gp} = \frac{\text{limit}}{\text{time} \times [\text{GP}] \times \text{assay volume}} \times \frac{\ln \text{limit}}{\text{limit} - \frac{\text{OD} - \text{τυφλό G1P}}{\text{τυφλό Pi}}}$$

B) Υπολογισμός του προϊόντος της αντίδρασης (GPa) ανά nmol $\gamma\text{-PhK}$ που καταλύεται από την $\gamma\text{-PhK}$

$$\text{Gpa } (\mu\text{mol}) / \text{nmolPhK} = \text{specific activity Gpa} \times \frac{\text{MB } \gamma\text{-trunk} \times [\text{GP}] \times \text{assay volume} \times 1000}{\text{MB Gp} \times V_{\text{max}} \times [\text{phK}] \times \text{assay volume}}$$

$$\text{limit} = 0,78 \times [\text{G1P}] \times \text{assay volume}$$

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v = V_{\text{max}}[\text{S}] / K_m + [\text{S}]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{max} : μέγιστη ταχύτητα, $[\text{S}]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([\text{S}])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ της V_{max} .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου II έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II [*Kurukulasuriya et al, 2003*].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά τις ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ και ενεργοποιείται από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Συνεπώς, η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτέλεσε έναν μοριακό στόχο για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου μέσω της μη-ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και έτσι προκύπτει η μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών.

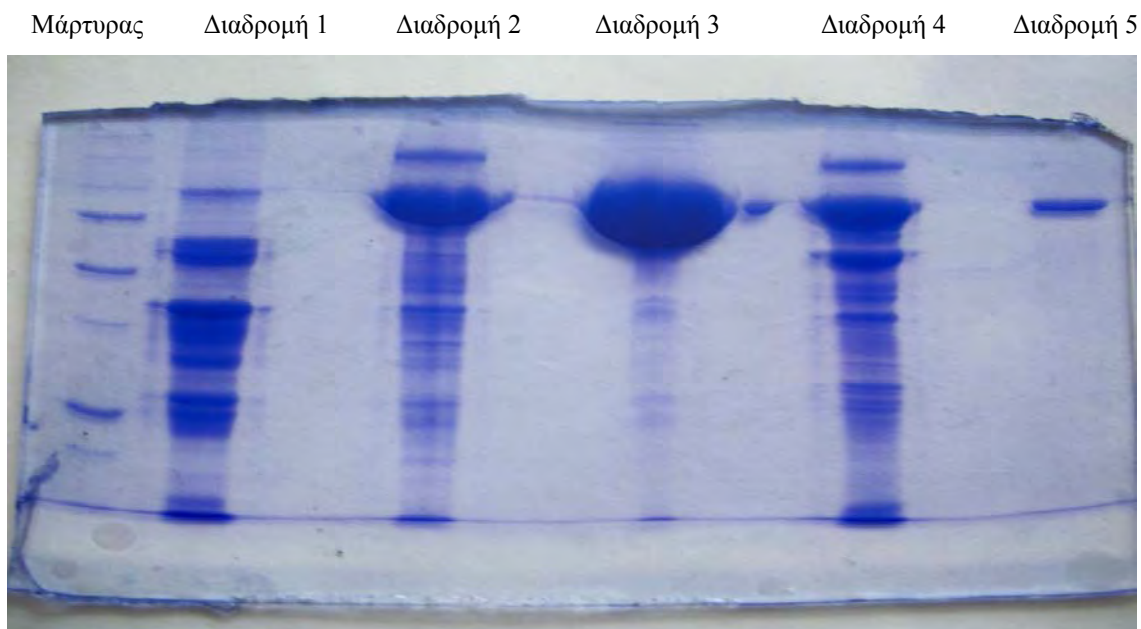
Η παρούσα πτυχιακή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο την μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης, της αναγνώρισης μικρομοριακών αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \Leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πορείας και συγκεκριμένα αποσκοπεί στη βιοχημική μελέτη ουσιών που έχουν απομονωθεί από φυσικά συστατικά και έχουν ως ενδεχόμενο στόχο την γ -καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για την υπομονάδα γ της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και εν συνεχεία πραγματοποιήσαμε κινητικές μελέτες δύο φυτικών ουσιών, έναντι της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ώστε να προσδιοριστεί η IC_{50} .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

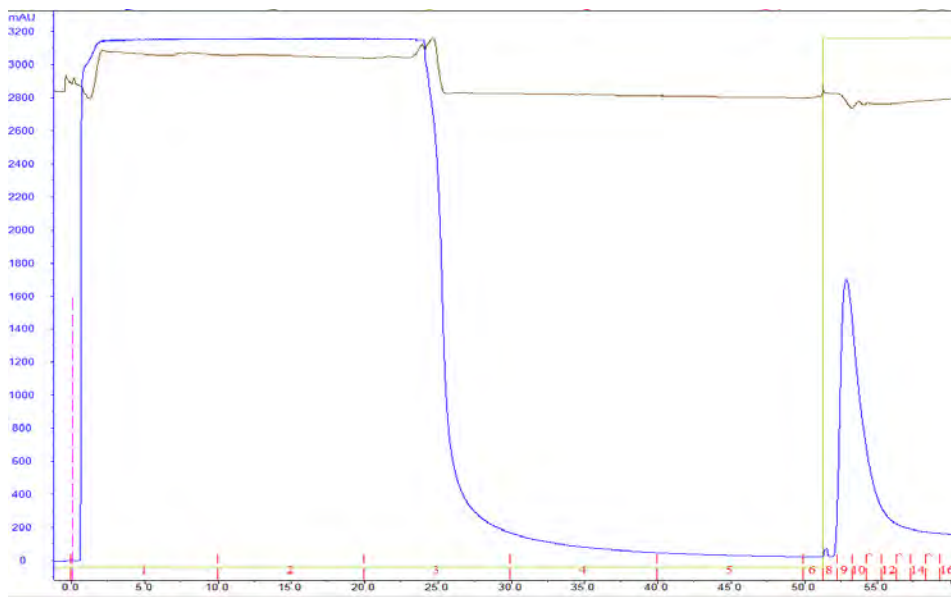
Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

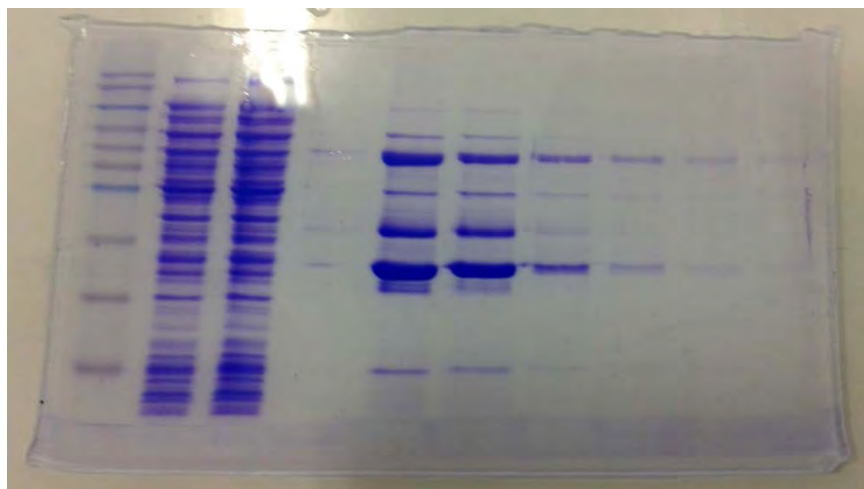
2. Απομόνωση της γ υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Α. Χρωματογραφία συγγένειας GST



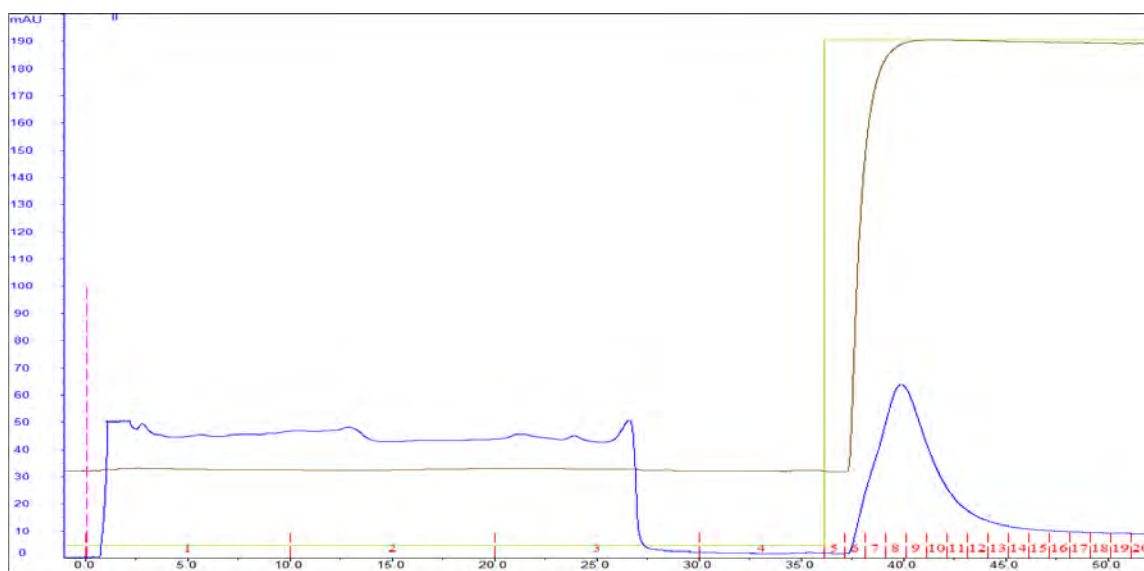
Εικόνα 20: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από την στήλη ProtinoGST/4B. Η έκλουση έγινε με 20mM γλουταθειόνη

Μάρτυρας Δ/μή 1 Δ/μή 2 Δ/μή 3 Δ/μή 4 Δ/μή 5 Δ/μή 6 Δ/μή 7 Δ/μή 8



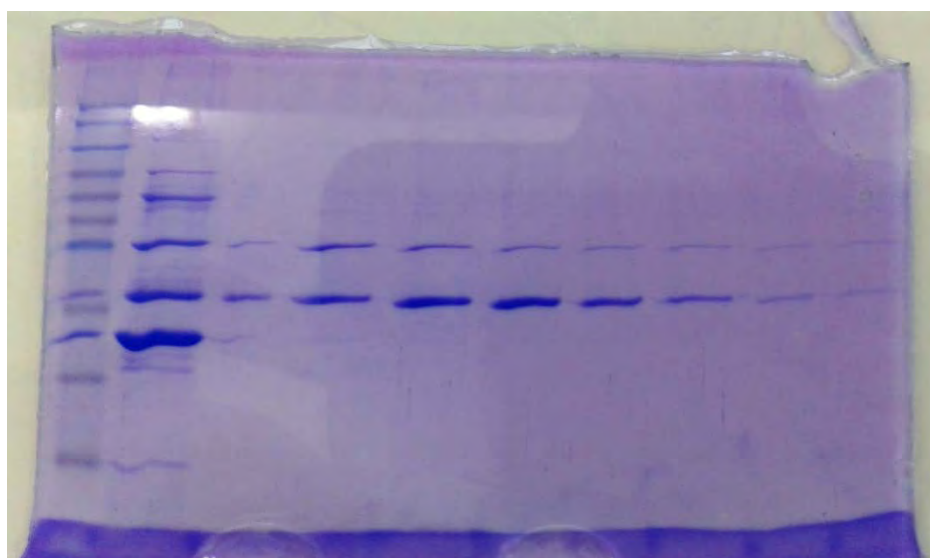
Εικόνα 21 : Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο πρώτο βήμα της απομόνωσης της γ-PhK με την Protino GST/4B. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη, το σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που δεν δεσμεύθηκε στη στήλη, ενώ στην τρίτη το διάλυμα μετά την έκπλυση της στήλης GSTTrap 4B. Στις υπόλοιπες διαδρομές το έκλουσμα της στήλης Protino GST/4B

Β. Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap Blue



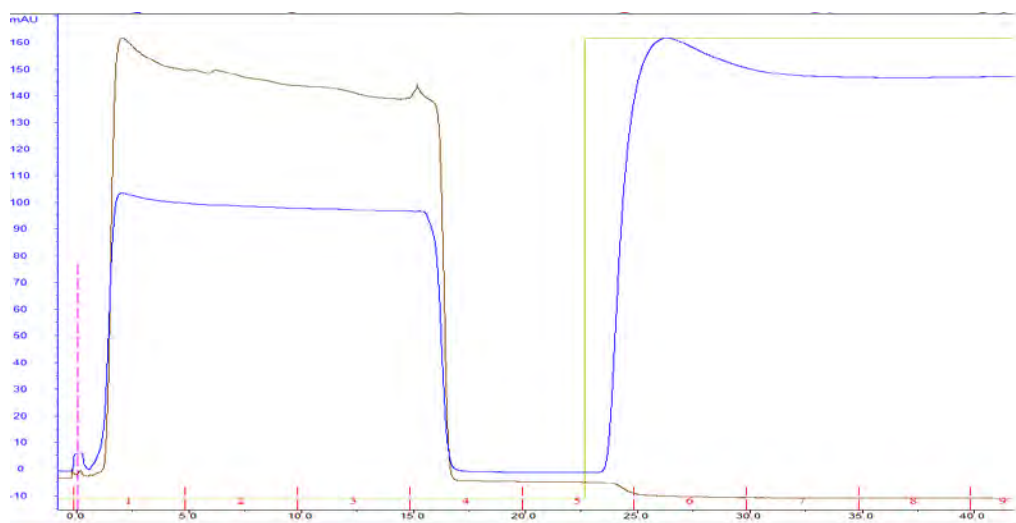
Εικόνα 22: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από την στήλη HiTrap Blue. Η έκλουση έγινε με 1M NaCl.

Μάρτυρας Δ/μή 1 Δ/μή 2 Δ/μή 3 Δ/μή 4 Δ/μή 5 Δ/μή 6 Δ/μή 7 Δ/μή 8 Δ/μή 9



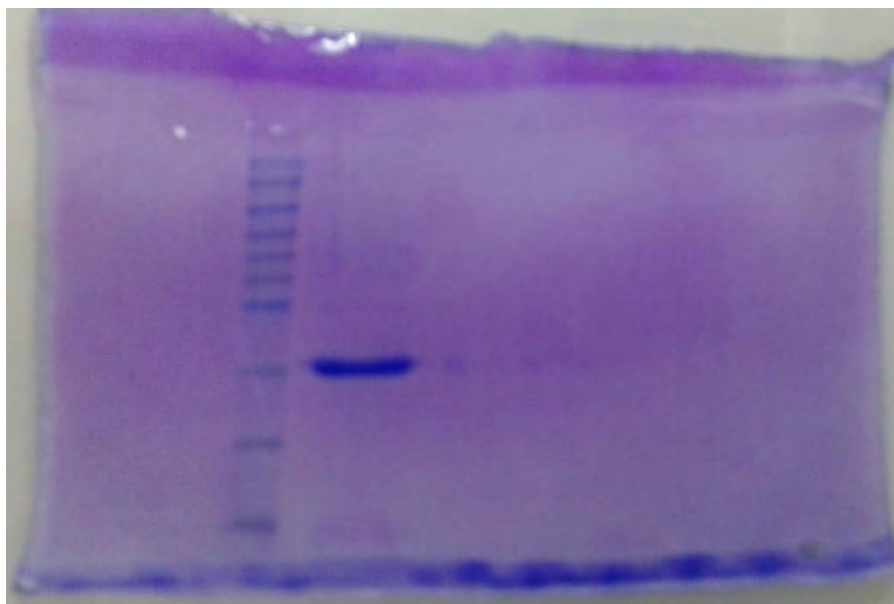
Εικόνα 23: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά την στήλη HiTrap Blue. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή έχουμε το δείγμα μετά την επώαση με την πρωτεάση 3C. Στις διαδρομές 3-9 παρουσιάζονται τα κλάσματα της έκλουσης της στήλης.

Γ. Χρωματογραφία συγγένειας GST



Εικόνα 24: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από την στήλη ProtinoGST/4B όπου η γ -Phk διέρχεται από την στήλη και δεσμεύονται η GST και η 3C. Η έκλουση έγινε με 20mM γλουταθειόνη.

Μάρτυρας Διαδρομή 1



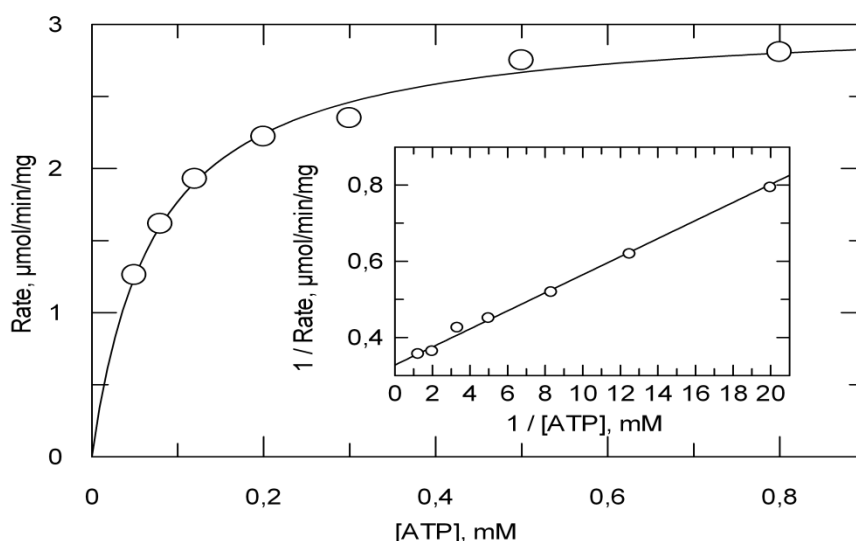
Εικόνα 25 : Ηλεκτροφόρηση πηκτής της τελικού δείγματος της καθαρής γ -Phk μετά την δεύτερη στήλη GSTTrap 4B. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας.

2. Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis και Menten δημοσίευσαν την πλέον κλασσική δημοσίευση [*Michaelis L., Menten M. L., 1913*], μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυματικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Οι μελέτες των Michaelis και Menten έγιναν χρησιμοποιώντας το ένζυμο ιμβερτάση [*Johnson K. A., et al., 2011*]. Η σταθερά K_m αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (ATP για το ένζυμο PhK) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m . (βλ. Πειραματικό μέρος, §4)

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m = 0.0724 \pm 0.0056$ mM και $V_{max} = 3.0536 \pm 0.0622$ $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$. Στην **Εικόνα 25** παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών/ $\text{min} \cdot \text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (ATP).



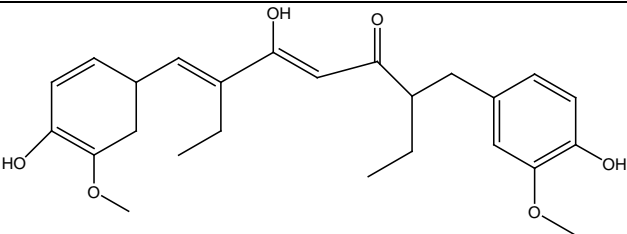
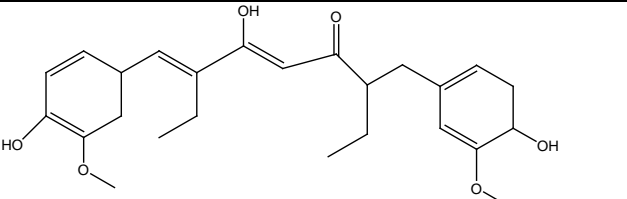
Εικόνα 26: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της γ -PhK σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος ATP. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk από το οποίο υπολογίζονται οι σταθερές K_m και V_{max} .

3. Κινητική μελέτη των φυσικών ενώσεων (Κουρκουμινών)

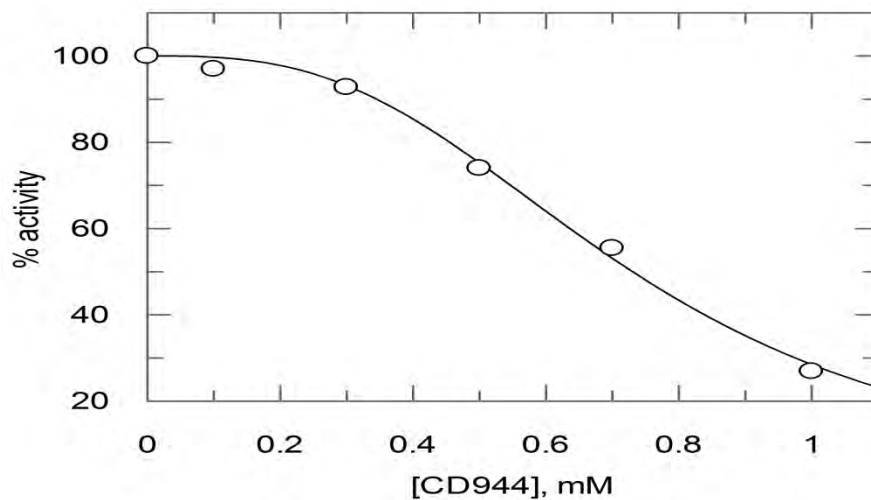
Προσδιορισμός IC_{50} .

Με τον όρο IC_{50} εννοούμε την συγκέντρωση εκείνη του αναστολέα όπου προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50%. Η τιμή της IC_{50} εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου (ή του μορίου-στόχου), του αναστολέα και του υποστρώματος (ή προσδέτη) παράλληλα με τις συνθήκες όπου πραγματοποιείται το πείραμα [*Cer R. Z., et al., 2009*].

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit. [*Leatherbarrow., 1998*]

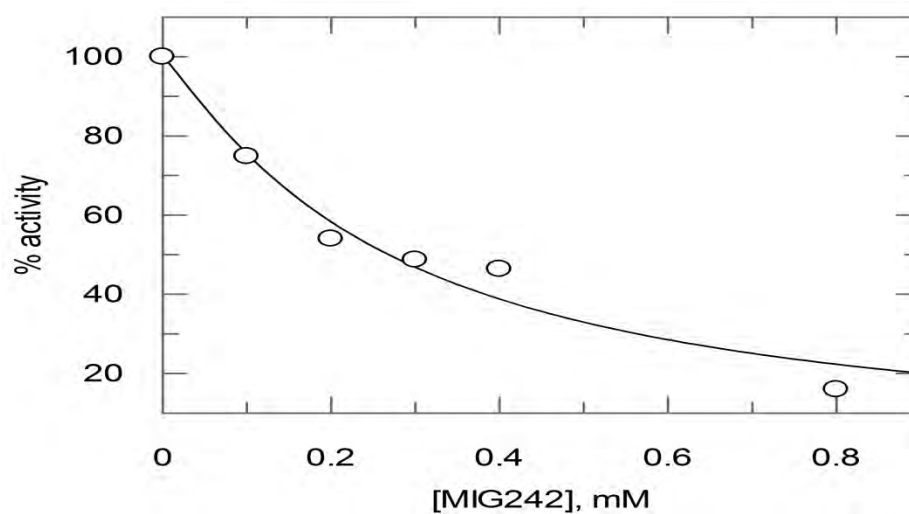
Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	IC_{50} (mM)
CD944		0,1mM, 0,3mM, 0,5mM, 0,7mM, 1mM	$0,73 \pm 0.01$
MIG242		0,1mM, 0,2mM, 0,3mM, 0,4mM, 0,8mM	$0,27 \pm 0.03$

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα IC_{50} .



Parameter	Value	Std.Error
IC ₅₀	0,7301	0,0140
Slope Factor	2.9291	0.1861

Εικόνα 27: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ένωσης CD944 και υπολογισμός της IC₅₀.



Parameter	Value	Std.Error
IC ₅₀	0,2685	0,0265
Slope Factor	1.1417	0.1884

Εικόνα 28: Καμπύλη της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ένωσης **MIG242** και υπολογισμός της IC₅₀.

Συμπερασματικά στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε ο χρωματογραφικός καθαρισμός της υπομονάδας γ της κινάσης της φωσφορυλάσης. Στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου Km και Vmax. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κινητική μελέτη δυο ενώσεων της CD944 και MIG242 για τον προσδιορισμό της IC₅₀. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο καλύτερος αναστολέας είναι ο MIG242, ενώ κρυσταλλογραφικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλούν αυτές οι δυο ενώσεις αλλά και για να εξηγηθεί η διαφορετική ανασταλτική δράση των δύο αυτών ενώσεων έναντι της γ-PhK.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που πραγματοποιείται στο εργαστήριο Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, που έχει ως στόχο την εύρεση και τον χαρακτηρισμό υπογλυκαιμικών ενώσεων που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα. Οι μελέτες θα επεκταθούν στη μελέτη και άλλων ενώσεων που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα με στόχο την εύρεση επιπλέον βιοδραστικών ενώσεων με πιθανή υπογλυκαιμική δράση. Όλες οι μελέτες αποσκοπούν στη παραγωγή σκευασμάτων που θα έχουν ως συστατικά τους, μεταξύ άλλων, φυσικές ενώσεις με υπογλυκαιμική δράση που θα είναι κατάλληλα για διαβητικούς και ίσως ακόμα να μπορούν να αποτελούν και μια εναλλακτική θεραπεία για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα στα αρχικά στάδια του σακχαρώδους διαβήτη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κινητικές Μελέτες στην Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου για την ανακάλυψη εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων.

Ο διαβήτης τύπου II στις μέρες μας είναι μία από τις πιο συχνές και διαδεδομένες παθήσεις η οποία χαρακτηρίζεται από ανικανότητα του ίδιου του οργανισμού για τη ρύθμιση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα. Με στόχο την θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, γίνονται προσπάθειες ώστε να βρεθούν εξειδικευμένα μόρια, ένζυμα και υποδοχείς που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης. Μελέτες έδειξαν πως εκτός από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ένας σημαντικός μοριακός στόχος για τον σχεδιασμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, η γ υπομονάδα της κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα και ακολούθησε ο χρωματογραφικός καθαρισμός της. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τις κινητικές μελέτες δύο φυσικών αναστολέων του CD944 και του MIG242, οι οποίοι προσδένονται στην καταλυτική γ -υπομονάδα της κινάσης.

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης έδειξαν πως οι ενώσεις CD944 και MIG242 παρουσιάζουν μέτρια ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου με σταθερές IC_{50} 730.1 μ M και 268.5 μ M αντίστοιχα. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες που είναι σε εξέλιξη θα επιβεβαιώσουν την σύνδεση αυτών των ενώσεων στην γ -PhK και θα παρουσιάσουν με λεπτομέρεια τους δεσμούς και τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι υπό μελέτη ενώσεις τόσο με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης όσο και με τα μόρια ύδατος.

ABSTRACT

Kinetic studies on Glycogen Kinase Phosphorylase as a potential hypoglycemic drug.

Nowadays, Type II Diabetes is one of the most common diseases and is characterized by the inability of the human body to regulate the glucose levels in the bloodstream. In order to treat this pathological situation, efforts were made to find specific molecules, enzymes, and receptors which play an important role in the regulation of glucose. Studies have shown that apart from hepatic glycogen phosphorylase, glycogen kinase phosphorylase is a very promising therapeutic target for the design of new hypoglycaemic drugs.

In the present study, γ -subunit of glycogen kinase phosphorylase was expressed in bacterial cultures followed by the chromatographic determination of the enzyme. In addition, kinetic studies were performed in two potential natural compounds, CD944 and MIG242, which are targeting the γ -catalytic site of the enzyme.

More specifically, the kinetic experiments revealed that the analogues CD944 and MIG242 are inhibitors of medium potency. The enzyme's activity was reduced to 50% (IC_{50} value) in concentration 268.5 μ M of MIG242 and 730.1 μ M of CD944. Crystallographic studies are in progress to examine the binding of the inhibitors on γ -PhK and also to provide the molecular details that govern small molecule recognition by γ -PhK.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✚ Alemany S. and Cohen P. (1986) FEBS Lett. 198, 194-202.
- ✚ Amodeo G.A., Rudolph M.J., Tong L., 2007. Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. Nature 449:492–95.
- ✚ Ayers N.A., Nadeau O.W., Read M.W., Ray P., Carlson G.M., 1998., Effector-sensitive cross-linking of phosphorylase b kinase by the novel cross-linker 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione. 1. 137-41.
- ✚ Bollen, M. and Stalmans, W. (1992) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27, 227-281.
- ✚ Carling D., Mayer F., Sanders M., Gamblin S., 2011. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. Nat. Chem. Biol. 7:512–18.
- ✚ Cole P.A., Grace M.R., Phillips R.S., Burn P., Walsh C.T., 1995. The role of the catalytic base in the protein tyrosine kinase Csk. J. Biol. Chem. 270:22105–8.
- ✚ Endicott J.A., Noble M.E.M., Johnson L.N., The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases, Annu. Rev. Biochem. 2012. 81:587–613.
- ✚ Fischer E.H., and Krebs E.G. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. J. Biol. Chem. 216, 121–132.
- ✚ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/662.htm>
- ✚ <http://www.syrostoday.gr/News/8443-Koyrkoymini--To-fysiko-antikarkiniko-votano.aspx>
- ✚ Iakoucheva L.M., Radivojac P., Brown C.J., O'Connor T.R., Sikes J.G., et al. 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. Nucleic Acids Res. 32:1037–49.
- ✚ Johnson D.A., Akamine P., Radzio-Andzelm E., Taylor S.S., 2001, Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase, 101 (8), pp 2243–2270
- ✚ Johnson L. N., Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors, The FASEB Journal (1992), Vol. 6 (2274-2282)
- ✚ Johnson L.N., Lewis R.J. 2001. Structural basis for control by phosphorylation. Chem. Rev. 101:2209–42.
- ✚ Krebs E.G., Love D.S., Bratvold G.E., Trayser K.A., Meyer W.L., Fischer E.H. (1964). Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase B kinase. Biochemistry 3, 1022–1033.
- ✚ Leatherbarrow R.J. (1998). Grafit version 4.06. Erithacus Software Ltd. Staines.UK
- ✚ Lowe E.D., Noble M.E., Skamnaki V.T., Oikonomakos N.G., Owen D.J., Johnson L.N., 1997. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. EMBO J. 16:6646–58.
- ✚ Lowe E.D., Noble M.E.M, Skamnaki V.T, Oikonomakos N.G., Owen D.J., Johnson L.N., 1997. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. The EMBO Journal Vol.16 No.22 pp.6646–6658.

- ✚ Lowe E.D., Noble M.E.M., Skamnaki V.T., Oikonomakos N.G., Owen D.J., Johnson L.N., The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition, 1997. *The EMBO Journal* Vol.16 No.22 pp.6646–6658.
- ✚ Madhusudan, Akamine P., Xuong N.H., Taylor S.S., 2002. Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nat. Struct. Biol.* 9:273–77.
- ✚ Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–34.
- ✚ Martin D.M., Miranda-Saavedra D., Barton G.J., 2009. Kinomer v. 1.0: a database of systematically classified eukaryotic protein kinases. *Nucleic Acids Res.* 37:D244–50.
- ✚ Martin J. L., Johnson L. N., Withers S. G., (1990), Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- ✚ McArdle W. D., Katch F. I. Katch V. L., (2000), *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- ✚ McLaughlin P.J., Stuart D.I., Klein H.W., Oikonomakos N.G., Johnson L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- ✚ Monod, J., Changeux, J.-P., Jacob, F. (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.
- ✚ Morral N.1., 2003, Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes, 14.169-75.
- ✚ Nadeau O.W., Anderson D.W., Yang Q., Artigues A., Paschall J.E., Wyckoff G.J., McClintock J.L., Carlson G.M. (2007). Evidence for the location of the allosteric activation switch in the multisubunit phosphorylase kinase complex from mass spectrometric identification of chemically crosslinked peptides. *J. Mol. Biol.* 365, 1429–1445.
- ✚ Nadeau O.W., Traxler K.W., Fee L.R., Baldwin B.A., Carlson, G.M. (1999). Activators of phosphorylase kinase alter the cross-linking of its catalytic subunit to the C-terminal one-sixth of its regulatory alpha subunit? *Biochemistry* 38, 2551–2559.
- ✚ Oikonomakos N.G., 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy, Pages 561-586 (26)
- ✚ Oikonomakos NG, Skamnaki V.T., Osz E, Szilágyi L, Somsák L, Docsa T, Tóth B, Gergely P., Kinetic and Crystallographic Studies of Glucopyranosylidene Spirothiohydantoin Binding to Glycogen Phosphorylase B, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10 (2002) 261–268.
- ✚ Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- ✚ Pickett-Gies C.A., Walsh D.A. (1986) Glycogen Phosphorylase Kinase. In Boyer P.D. and Krebs E.G. (eds), *The Enzymes*. Academic Press, Orlando, FL, Vol. 17, pp. 396–459.

- ✚ Roach P.J., Depaoli-Roach A.A., Hurley T.D., Tagliabracci V. S., Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes, *Biochem. J.* (2012) 441, 763–787
- ✚ Skamnaki V.T., Owen D.J., Noble M.E., Lowe E.D., Lowe G., et al. 1999. Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry* 38:14718–30.
- ✚ Somsak L., 2010, Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase, *C. R. Chimie* 14 (2011) 211–223.
- ✚ Steinberg G.R., Kemp B.E., 2009. AMPK in health and disease. *Physiol. Rev.* 89:1025–78.
- ✚ Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 5η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- ✚ Townley R., Shapiro L., 2007. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* 315:1726–29.
- ✚ Trempe, M.R., Carlson, G.M., Hainfeld, J.F., Furcinitti, P.S., Wall, J.S. (1986). Analyses of phosphorylase kinase by transmission and scanning transmission electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 261, 2882–2889.
- ✚ Tsirkone V., Tsoukala E., Lamprakis C., Manta S., Hayes J.M., Skamnaki V.T., Drakou C., Zographos S.E., Komiotis D., Leonidas D, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (2010) 3413–3425.
- ✚ Venien-Bryan C., Jonic S., Skamnaki V.T., Brown N., Bischler N., Oikonomakos N.G., Boisset N., Johnson L.N., The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase DOI 10.1016/j.str.2008.10.013.
- ✚ Venien-Bryan C., Jonic S., Skamnaki V.T., Brown N., Bischler N., Oikonomakos N.G., Boisset N., Johnson L.N., 2008. The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase. str.2008.10.013.
- ✚ Venien-Bryan C., Lowe E.M., Boisset N., Traxler K.W., Johnson L.N., Carlson G.M. (2002). Three-dimensional structure of phosphorylase kinase at 22 Å resolution and its complex with glycogen phosphorylase b. str. 2002 10. 33-41.
- ✚ Wilkinson, D.A., Norcum, M.T., Fitzgerald, T.J., Marion, T.N., Tillman, D.M., Carlson, G.M. (1997). Proximal regions of the catalytic gamma and regulatory beta subunits on the interior lobe face of phosphorylase kinase are structurally coupled to each other and with enzyme activation. *J. Mol. Biol.* 265, 319–329.
- ✚ Xiao B., Heath R., Saiu P., Leiper F.C., Leone P., et al. 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449:496–500.
- ✚ Xiao B., Sanders M.J., Underwood E., Heath R., Mayer F.V., et al. 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472:230–33.

- ✚ Xu, Y.H., Wilkinson, D.A., Carlson, G.M. (1996). Divalent cations but not other activators enhance phosphorylase kinase's affinity for glycogen phosphorylase. *Biochemistry* 35, 5014–5021.
- ✚ Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.